

KARINA BORTOLIN LODI

**REPERCUSSÕES MINERAIS ÓSSEAS NO ALCOOLISMO
CRÔNICO ASSOCIADO À DEFICIÊNCIA HORMONAL EM
RATOS**



2010

KARINA BORTOLIN LODI

**REPERCUSSÕES MINERAIS ÓSSEAS NO ALCOOLISMO CRÔNICO
ASSOCIADO À DEFICIÊNCIA HORMONAL EM RATOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos de obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Prof^a Adj^a. Rosilene Fernandes da Rocha

Co-orientadora: Prof^a Dr^a. Ana Maria do Espírito Santo

São José dos Campos

2010

BANCA EXAMINADORA

- 1) Prof^a. Adj^a. Rosilene Fernandes da Rocha (Orientadora)
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

- 2) Prof. Adj. Lafayette Nogueira Junior
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

- 3) Dr^a. Renata Andrade Bitar

- 4) Prof^a Tit. Yasmin Rodarte Carvalho
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

- 5) Prof^a. Dr^a. Vilma Leyton
Faculdade de Medicina de São Paulo
Universidade de São Paulo – USP

São José dos Campos, 12 de julho de 2010.

DEDICATÓRIA

À Deus, por toda nossa vida.

Ao meu marido Matheus,
Obrigada por acreditarem na possibilidade e me
incentivarem a prosseguir, com apoio em todo
tempo, tendo paciência e até mesmo ajudando no
experimento. Te amo e te admiro muito!

À minha família Altemar, Amarli e Samuel,
Só tenho a agradecer pelo que sou. Sem vocês,
com certeza este sonho não seria possível. Faço
desta, a realização de vocês. Amo vocês!

Aos meus avôs,
Pela saudade desmedida, pelo carinho, pelo
exemplo de vida e pelo maior amor do mundo.

“ A vida sobretudo ocorre no intervalo entre os grandes
momentos. Grande parte do que precisamos aprender se encontra nos
pequenos eventos da vida!”
Elizabeth Kübler-Ross

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Rosilene Fernandes da Rocha, que ultrapassou a sua função de orientadora, com sua amizade, disponibilidade e experiência. Minha formação terá sempre esse toque especial de quem soube me acolher, buscando sempre ensinar a fazer pesquisa de valor.

À minha co-orientadora Ana Maria do Espírito Santo, agradeço imensamente a dedicação. Sua competência me passava segurança, seu sorriso e entusiasmos, sempre presentes, me faziam mais tranqüila durante os experimentos.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”
Cora Coralina

AGRADECIMENTO

Esta tese está sendo concluída após um empenho diário de quatro anos. Esforço este apoiado no auxílio de vários amigos. É difícil citar o nome de todos os envolvidos. Existiram, entretanto, colaboradores imprescindíveis, a quem devo agradecer especialmente:

À Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, representada pelo Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos Prof. Adj. José Roberto Rodrigues e ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Prof^a. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito, pela oportunidade concedida.

À Coordenadoria do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) pelo apoio financeiro.

À Universidade do Vale do Paraíba, representada pelo Reitor Prof. Dr. Baptista Gargione Filho por ceder seus laboratórios, equipamentos e professores. Também agradeço à Prof^a. Dr^a. Emilia Angela Loschiavo Arisawa, Prof. Dr. Luis Eduardo Silva Soares, Prof. Dr. Airton Abrahão Martin, Prof. Dr. Leandro Procópio Alves, e os alunos Carolina da Silva Carvalho, Geraldo Magno Alves de Abreu, Edson Aparecido Pereira dos Santo, sempre voluntariosos e atenciosos, pessoas que fazem de seu local de pesquisa um verdadeiro lar aos que ali passam.

Aos queridos docentes Prof^a. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho, Prof^a. Dr^a. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão, Prof^a. Adj^a. Cristiane Yumi Koga Ito, Prof^a. Adj^a. Janete Dias Almeida e Prof. Dr. Leonardo Marchini pela colaboração, atenção, educação e gentileza, predicados encontrados nestas pessoas tão especiais.

Aos docentes Prof. Tit. Horácio Faig Leite, Prof. Dr. Ivan Balducci, Prof^a. Dr^a. Juliana Campos Junqueira, Prof^a. Dr^a. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, Prof^a.Adj^a. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante, Prof. Tit. Luiz Cesar de Moraes, Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa, Prof^a. Adj^a. Mari Elí Leonelli de Moraes, Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, Prof^a. Dr^a. Ana Lia Anbinder e Prof^a. Dr^a. Luciane Dias de Oliveira que mesmo no pouco convívio, demonstraram o prazer de pesquisar, conhecer e transmitir, de maneira atrativa aos estudantes, o maravilhoso mundo do conhecimento.

Ao Prof. Adj. Lafayette Nogueira Junior pelo inestimável auxílio nos testes biomecânicos e à Prof^a. Dr^a. Valéria Abrantes Pinheiro Carvalho por me conduzir ao doutorado.

Aos queridos alunos de iniciação científica e estagiários, a quem devo um agradecimento especial pela ajuda na execução dos experimentos: Érika Cristina Sbrisse Pereira, Isabel Chaves Silva Carvalho, Emmanuel da Silva Rovai, Gabriela da Silva Freitas, Geraldo Marques Miranda e Alberto Toseto Binde.

Aos colegas Pós-Graduandos da UNESP, em especial Juliana Madureira de Souza Lima Alonso, Cristina Werkman, Camila Porto Deco, Giselle Segnini Senra, Adriana Mathias Pereira da Silva Marchini, Maria José Domingues Castro, com as quais tive o privilégio de conviver nestes últimos anos, cada qual com suas ocupações e dificuldades, buscando sempre alcançar um melhor preparo para, um dia, compartilhar o conhecimento.

Aos funcionários e técnicos Ana Lourdes da Silva Machado, Maria Salete Faria, Lourival Jacobs, Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos e Marco Antonio Correa Alfredo. Às secretárias da pós-graduação, Rosemary da Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consiglio de Souza e Lilian Faria das Graças.

Aos meus colegas de profissão do laboratório Oswaldo Cruz, diretor-presidente Héctor Enrique Giana e farmacêutica Janaína Ribeiro da Silva, pela grande colaboração na realização das análises bioquímicas.

Agradeço também à minha nova família: Jandira Margarida Gongora Lodi, Talita Gongora Lodi, Marilene Aparecida Lodi, Olga Maria Lodi e Lucia Helena Lodi. Obrigada pelo apoio e pela torcida!

Meu profundo respeito aos animais deste experimento, que tiveram sua vida sacrificada em benefício da ciência durante a realização deste trabalho científico.

*“Conte-me e eu esquecerei;
Ensina-me e eu me lembrarei;
Envolve-me e eu aprenderei.”*

Benjamim Franklin

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE QUADROS E TABELAS	14
LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	15
RESUMO.....	18
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3 PROPOSIÇÃO.....	47
3.1 Objetivos específicos	47
4 MATERIAL E MÉTODO.....	48
4.1 Animais.....	48
4.2 Protocolo experimental	48
4.3 Delineamento experimental	49
4.4 Dieta	50
4.4.1 Líquida.....	51
4.4.2 Sólida.....	52
4.5 Procedimentos cirúrgicos.....	53
4.5.1 Anestesia e analgesia.....	53
4.5.2 Ovariectomia e falsa ovariectomia (Sham).....	54
4.5.3 Orquiectomia e falsa orquiectomia (Sham)	55
4.5.4. Coleta de sangue.....	56

4.5.5 Eutanásia.....	57
4.6 Variáveis estudadas.....	58
4.6.1 Análises biométricas e nutricionais	59
4.6.2 Análises das propriedades biomecânicas	61
4.6.3 Quantificação mineral óssea	65
4.6.4 Parâmetros bioquímicos	68
4.7 Análises Estatísticas	69
5 RESULTADOS	71
5.1 Análises biométricas e nutricionais	71
5.2 Análises das propriedades biomecânicas	76
5.3 Quantificação mineral óssea.....	80
5.4 Parâmetros bioquímicos	83
6 DISCUSSÃO	86
7 CONCLUSÃO	105
8 REFERÊNCIAS	106
ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA....	131
ABSTRACT	132

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama de obtenção do espectro de fluorescência de raios-x.....	45
Figura 2 -	Delineamento experimental.....	50
Figura 3 -	Cirurgia de Ovariectomia: a) incisão da pele e da camada muscular; b) exposição do ovário e tecido mole circundante; c) ovário e tecido mole removido.....	55
Figura 4 -	Cirurgia de Orquiectomia: a) desinfecção do escroto e incisão na pele e músculo; b) ligadura do pedículo vascular; c) remoção do testículo.....	56
Figura 5 -	Coleta do sangue pela artéria abdominal.....	57
Figura 6 -	Distribuição dos fêmures por análise.....	59
Figura 7 -	Medição do fêmur com paquímetro digital.....	61
Figura 8 -	A: máquina universal de ensaio. B: teste de flexão-compressão em 3 pontos no fêmur.....	63
Figura 9 -	A: <i>laserpoint</i> indicando ponto inicial da leitura. B: espectrômetro de microfluorescência de raios-x.....	67
Figura 10 -	Exemplo da obtenção da concentração em forma de gráfico dos minerais fósforo (A) e cálcio (B) nos fêmures de ratos.....	67

Figura 11 - Média e desvio-padrão dos valores de evolução ponderal (grama) obtidos de todos os grupos experimentais.....	72
Figura 12 - Média e desvio-padrão dos valores de comprimento femoral (mm) obtidos em todos os grupos experimentais.....	75
Figura 13 - Média e desvio-padrão dos valores de diâmetro femoral (mm) obtidos em todos os grupos experimentais.....	76
Figura 14 - Média e desvio-padrão dos valores de carga máxima (N) obtidos em todos os fêmures dos grupos experimentais.	77
Figura 15 - Média e desvio-padrão dos valores de rigidez ($\times 10^3$ N/m) obtidos em todos os fêmures dos grupos experimentais.....	78
Figura 16 - Média e desvio-padrão dos valores do módulo de elasticidade (mPa) obtidos em todos os fêmures dos grupos experimentais.....	79
Figura 17 - Média e desvio-padrão dos valores da resistência máxima (mPa) obtidos em todos os fêmures dos grupos experimentais.....	80
Figura 18 - Média e desvio-padrão dos valores de cálcio (%) obtidos do fêmur em todos os grupos experimentais.....	81
Figura 19 - Média e desvio-padrão dos valores de fósforo (%) obtidos do fêmur de todos os grupos experimentais.....	82
Figura 20 - Média e desvio-padrão dos valores da proporção cálcio/fósforo (mol) obtidos do fêmur de todos os grupos experimentais.....	83

Figura 21 - Média e desvio-padrão dos valores de cálcio plasmático (mg/dL) obtidos do sangue de todos os grupos experimentais.....	84
Figura 22 - Média e desvio-padrão dos valores de fosfato plasmático (mg/dL) obtidos do sangue de todos os grupos experimentais.....	85

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Composição da dieta padrão utilizada na alimentação dos animais.....	52
Tabela 1 -	Grupos experimentais de ratas fêmeas.....	49
Tabela 2 -	Grupos experimentais de ratos machos.....	49
Tabela 3 -	Média diária por animal do quociente de eficiência alimentar (%), ingestão calórica (kcal) e hidratação (mL).....	74
Tabela 4 -	Média e desvio padrão dos valores de minerais (Ca e P) obtidos nas análises em todos os grupos experimentais.....	131
Tabela 5 -	Média e desvio padrão dos valores biométricos e nutricionais obtidos nas análises em todos os grupos experimentais.....	132
Tabela 6 -	Média e desvio padrão dos valores biomecânicos obtidos nas análises em todos os grupos experimentais.....	132

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% = por cento

$[\text{Ca}_{10}(\text{PO})_4]_6(\text{OH})_2$ = hidroxiapatita

μEDXRF = microfluorescência de raios-x

$\mu\text{g/mL}$ = micrograma por mililitro

μm = micrômetro

ad libitum = à vontade (latim)

ADH = álcool desidrogenase

ALDH = aldeído-desidrogenase

$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ = etanol ou álcool etílico

Ca = elemento químico cálcio

Ca/P = proporção cálcio-fósforo

CID-10 = classificação internacional de doenças e problemas relacionados à saúde

Cl = elemento químico cloro

CO_3^{-2} = íon carbonato

COBEA = Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CSMI = *cross sectional moment of inertia*

CYP450 = citocromo P450

DEXA = absorciometria de dupla emissão de raios-x

DMO = densidade mineral óssea

DSM-IV = *diagnostic and statistical manual of mental disorders*

EDXRF = fluorescência de raios-x

EUA = Estados Unidos da América

F = elemento químico flúor

FDA = *Food and Drug Administration*

g = grama

g/kg = grama por quilograma

g/L = grama por litro

GABA-A = ácido gama aminobutírico-A

HPO_4^{-2} = íon fosfato

IGF-I = fator de crescimento semelhante à insulina

IL = interleucina

K = elemento químico potássio

kcal = kilocaloria

kcal/g = kilocaloria por grama

keV = quiloeletrovolt

kg = quilograma

kg/m² = quilograma por metro quadrado

Kgf = quilograma-força

kV = kiloVolt

MEOS = sistema microsomal de oxidação do álcool

Mg = elemento químico magnésio

mg = miligrama

mg/dL = miligrama por decilitro

mg/kg = miligrama por quilograma

mg/kg/h = miligrama por quilograma por hora

mL = mililitro

mL/kg = mililitro por quilograma

mm = milímetro

mm/min = milímetro por minuto

mPa = megaPascal

mW = miliWatt

N = Newton

N/m = Newton por metro

Na = elemento químico sódio

NAD^+ = nicotinamida-adenina dinucleotídeo

NADH = nicotinamida-adenina dinucleotídeo hidrogenado

NADP^+ = nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH = nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato hidrogenado

Nm = nanômetro

NMDA = N-metil-D-aspartato

°C = grau Centígrado

°GL = grau Gay Lussac

OMS = Organização Mundial de Saúde

OQT = orquiectomia

OVX = ovariectomia

P = elemento químico fósforo

PA = para análise (grau analítico)

ppm = parte por milhão

PTH = hormônio paratireoideano

RANK = receptor do ativador do fator nuclear Kappa B

Rh = ródio

s = segundos

Sham = falso (inglês)

Si(Li) = silício-lítio

SNC = sistema nervoso central

UI = unidade internacional

v/v = volume a volume

WHO = *World Health Organization*

Π = constante circular pi

Lodi KB. Repercussões minerais ósseas no alcoolismo crônico associado à deficiência hormonal em ratos [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2010.

RESUMO

O alcoolismo se relaciona com a redução da massa óssea, aumenta o risco de fraturas e, ocorrendo a fratura, pode piorar o reparo ósseo. Acima de tudo, fraturas e alcoolismo são associados a longos períodos de hospitalização e alta mortalidade. Mais de 50% dos atendimentos ambulatoriais de alcoólicos mostram evidências de perda óssea. Além disso, já foi evidenciada em humanos e animais uma relação negativa entre consumo de etanol e densidade mineral óssea. A origem desses efeitos deletérios pode ocorrer além da ação direta no osso, sendo através dos distúrbios hormonais e deficiências nutricionais que acompanham os casos de consumo excessivo de etanol. O objetivo deste estudo foi investigar a resposta biomecânica sobre o fêmur de ratos, bem como os parâmetros bioquímicos e de composição mineral óssea decorrente da deficiência hormonal e consumo crônico de etanol. Ratos Wistar machos e fêmeas (n=108) foram divididos em machos orquiectomizados (ORQ), fêmeas ovariectomizadas (OVX) ou Sham-operados, e subdivididos de acordo com a dieta (grupos *ad libitum*, isocalórico e etanol 20%). Após um mês da cirurgia, os animais foram alimentados diariamente com a dieta controlada por 8 semanas. Foram avaliadas as condições nutricionais. Ca e P foram analisados por teste bioquímico no sangue e por espectrometria de fluorescência de raios-x no fêmur. As propriedades biomecânicas também foram analisadas pelo teste de flexão em 3 pontos. Os dados revelam que a deficiência hormonal promove ganho de massa corporal nas fêmeas e perda nos machos. Os resultados também revelam hiperfosfatemia plasmática nos grupos etanol-ORQ e etanol-OVX. Redução da proporção molar de Ca/P e de Ca ósseo em todos os grupos de dieta alcoólica. Do mesmo modo, a espectrometria revelou perda de P ósseo nos grupos Sham-*ad libitum*. As propriedades biomecânicas foram afetadas pela deficiência hormonal somente nos machos. A relação entre o consumo de etanol e a deficiência hormonal suporta a hipótese que estes fatores sinergicamente modificam a nutrição corporal, rompem a homeostasia de Ca e P e podem comprometer, de forma significativa, a estrutura da hidroxiapatita, tornando-se um fator de risco importante para a osteoporose.

Palavras-chave: Alcoolismo. Osso. Deficiência hormonal. Rato. Espectroscopia de emissão de raios-x.

1 INTRODUÇÃO

Muito se tem publicado e discutido a cerca da relação entre consumo de álcool etílico e seus efeitos na promoção da osteoporose. Ambos compartilham das características de serem patologias progressivas e de elevada morbidade.

Assim como a osteoporose, o alcoolismo é também um problema de grande prevalência populacional e alto custo social. A mensagem que o consumo de bebidas alcoólicas pode trazer somente benefícios para saúde cardiovascular se converte em engano quando se descontextualiza do elevado número de patologias e transtornos que este consumo pode provocar.

O risco de ocorrência de fraturas por traumatismos mínimos como as quedas ou mesmo em acidentes automobilísticos, muito comuns em pacientes alcoólicos, tornam-se ainda mais preocupante quando estes indivíduos são acometidos pela osteoporose; uma patologia ósseo-metabólica, que pode progredir sem detecção por décadas (Nordin, 2009).

Estima-se que as fraturas osteoporóticas alcancem proporções endêmicas nos próximos anos, pois o crescente da expectativa de vida da população tem contribuído para a maior incidência desta doença crônico-degenerativa (World Health Organization, 2007).

As anormalidades na homeostasia dos componentes que constituem os ossos, como é o caso do cálcio e do fósforo, podem ser desencadeadas por alterações tanto metabólicas, nutricionais e hormonais (Moe, 2008).

Sabe-se que há uma relação direta entre o metabolismo endócrino e ósseo, e há também evidências em relação à ação do etanol sobre os mesmos (Novoa et al., 1998; Chakkalakal, 2005).

Em situações patológicas como a osteoporose, vários estudos têm se preocupado com o desenvolvimento de novas tecnologias nas áreas da bioengenharia e a ampliação dos conhecimentos voltados para novos métodos investigativos e diagnósticos. Para definir a qualidade e a composição óssea, é possível avaliar as estruturas ósseas através de parâmetros que quantifiquem os minerais presentes, bem como a microestrutura óssea e as cargas suportadas pelo osso (Licata, 2009).

Considerando que o alcoolismo é um fator agravante para a osteoporose, e quando associadas, estas duas patologias elevam o risco para queda e fraturas graves, justifica-se assim, a contínua busca do conhecimento da fisiopatologia e de novos métodos diagnósticos destas doenças. Para tanto este trabalho propõe avaliar em ratos com deficiência hormonal, as alterações decorrentes do consumo crônico de etanol.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O alcoolismo é uma toxicomania decorrente da ingestão excessiva e contínua de álcool etílico. É uma patologia crônico-progressiva e multifatorial, envolvida em fatores biológicos (Marques, 2001; Ayesta, 2002), genéticos (Edenberg, 2007) psicológicos e sociais (Ramos; Woltowitz, 2004; Fernandes, 2007).

A definição e os critérios que determinam a dependência ao álcool etílico tem-se modificado desde a sua primeira descrição pelo médico sueco Magnus Huss em 1849, no artigo "*Alcoholismus Chronicus*" (Gigliotti; Bessa, 2004).

Atualmente, o diagnóstico mais aceito para este transtorno é baseado na classificação internacional de doenças (CID-10 - 1997) da Organização Mundial de Saúde (OMS), e no manual de diagnóstico e estatístico dos distúrbios mentais da *American Psychiatric Association* (DSM-IV - 1994).

O consumo de bebidas alcoólicas acompanha a história da humanidade, concomitantemente, vem sendo observado por pesquisadores, o aumento progressivo na concentração alcoólica destas bebidas a partir da idade média. Além disso, estudos epidemiológicos têm detectado índices de consumo cada vez maiores tanto no Brasil, como em outras regiões do mundo, tornado-se patológico e endêmico principalmente após a Revolução Industrial (Marques, 2001; Moraes et al., 2006; Laranjeira et al., 2007).

Ainda que a grande maioria da população tenha conhecimento sobre os efeitos nocivos da ingestão excessiva de etanol (Borges et al., 2009), estima-se que cerca de 90% da população adulta

mundial consome esporadicamente algum tipo de bebida alcoólica, sendo que destes, quase um terço ingere mais que moderadamente (Ramos; Woitowitz, 2004; WHO, 2007).

O consumo de bebidas alcoólicas no Brasil é legalmente permitido para maiores de 18 anos de idade. Apesar da legislação, não há efetividade no cumprimento desta lei e por isso, muitos indivíduos desde a adolescência abusam do consumo de etanol, tornando-se um forte fator desencadeante de alcoolismo na idade adulta (Laranjeira et al., 2007).

A prevalência do uso de álcool etílico representa uma parcela substancial dos pacientes atendidos ambulatorialmente em todo o mundo. Segundo dados publicados pela OMS, o consumo de etanol é responsável por 3,2% de todas as mortes prematuras no mundo, chegando a 1,8 milhões de óbitos por ano. De acordo com o mesmo relatório, estima-se que entre 10 a 18% dos casos de pacientes atendidos em emergências hospitalares estejam relacionados ao consumo excessivo desta substância (WHO, 2007).

Rigo et al. (2005) relataram que nos Estados Unidos da América (EUA), 71,8% dos casos de trauma ocorrem em pacientes alcoolizados. No Brasil, os dados sobre acidentes são semelhantes, e a incidência de consumo é comparável a países mais desenvolvidos, uma vez que os relatos apontam que mais da metade da população brasileira ingere algum tipo de bebida alcoólica, e destes, somente 25% consomem moderadamente (Laranjeira et al., 2004; Segatto et al., 2008).

Os limites que norteiam o consumo de bebidas alcoólicas e seus efeitos no organismo são definidos pela “dose”. Apesar desta denominação, não há um consenso mundial sobre a quantidade de grama de etanol que esta dose corresponde. No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Medicina de Tráfego (2008), uma dose corresponde a 12 grama de etanol e equivale aproximadamente a uma lata de cerveja, uma taça de vinho ou meio copo de uísque.

Para obter as unidades-equivalentes a uma dose em grama de uma determinada bebida alcoólica, é preciso multiplicar a quantidade da mesma por sua alcoolatura, chegando à quantidade absoluta de álcool etílico da bebida. Nos EUA, por outro lado, adotou-se como parâmetro de dose, a medida da bebida alcoólica em volume, que corresponde a 355 mL de cerveja, 148 mL de vinho ou 44,4 mL de bebidas destiladas em geral (Ferner; Chambers, 2001; Keer et al., 2005).

De acordo com a nova regulamentação do Código de Trânsito Brasileiro, o limite máximo de consumo de etanol para um indivíduo ser considerado não alcoolizado é de 0,2 g/L, uma vez que a capacidade de desempenhar funções cruciais para a condução de veículos, encontra reduzida com alcoolemia acima de 0,5 g/L. (Associação Brasileira de Medicina de Tráfego, 2008; Brasil, 2008).

O etanol, sinônimo de álcool etílico (C_2H_5OH), é o principal componente das bebidas alcoólicas destiladas ou fermentadas, é quimicamente uma molécula de baixo peso molecular, de altíssima solubilidade hídrica e lipídica (Gemma et al., 2006).

Quando ingerido, sua absorção ocorre nas mucosas do trato gastrointestinal, especialmente no estômago (20%) e no duodeno (80%). Após a absorção é distribuído entre 30 a 90 minutos por todos os líquidos corpóreos intra e extracelulares (Paton, 2005; Gemma et al., 2006).

O etanol é biotransformado em cerca de 90% por três distintos mecanismos, utilizando primordialmente o princípio de oxirredução. Os 10% restantes são eliminados de forma inalterada pelos pulmões, rins, suor e saliva (Paton, 2005; Gifford et al., 2008).

O primeiro sistema de biotransformação ocorre via desidrogenase alcoólica no citosol de células gástricas e nos hepatócitos. A enzima álcool desidrogenase (ADH) catalisa o passo inicial da biotransformação do álcool etílico transformando-o em acetaldeído, um metabólito ativo altamente tóxico ao sistema nervoso central (SNC), com

atividade mutagênica e carcinogênica (Zakhari, 2006; Seitz; Becker, 2007).

Nesta primeira etapa de oxidação, um próton de hidrogênio do etanol é transferido para uma molécula de NAD^+ , que por sua vez é reduzida a NADH, gerando acetaldeído. Subsequentemente, o acetaldeído formado, é convertido em acetato por uma segunda enzima mitocondrial, a aldeído desidrogenase (ALDH), que também utiliza como catalizador da reação, a transferência de um próton de hidrogênio do NAD^+ para o NADH. O acetato é, então, rapidamente convertido em água e dióxido de carbono (Mezey, 1980; Lieber, 2001; Paton, 2005; Gemma et al., 2006).

O segundo mecanismo de biotransformação segue a via do sistema microsomal de oxidação do álcool (MEOS) no retículo endoplasmático dos hepatócitos, através do complexo enzimático citocromo P450 isoforma 2E1 (CYP450 2E1). Este mecanismo é acionado quando há um consumo exacerbado de bebida alcoólica, metabolizando cerca de 10% do etanol que se encontra no fígado. O citocromo P450 também converte o álcool etílico em acetaldeído, oxidando NADPH, em NADP^+ . A terceira e menor fração de biotransformação do etanol ocorre nos peroxissomos sob ação da enzima catalase (Paton, 2005; Gemma et al., 2006; Zakhari, 2006; Lu; Cederbaum, 2008). É nesta grande movimentação de elétrons da oxidação do etanol que ao reduzir o NADP^+ para a forma NADPH e o NAD^+ para o NADH, gera elétrons livres que são usados nas mitocôndrias como fonte de energia. (Mezey, 1980; Lieber, 2003; Lu; Cederbaum, 2008).

O etanol é oxidado seguindo a cinética de ordem zero, pois a velocidade de biotransformação é constante e independente da sua concentração sanguínea. Em ratos, a saturação desta biotransformação é de aproximadamente 700 mg/kg/h. O tempo de meia-vida farmacológica após a ministração intravenosa de 250 mg/kg nestes animais é de 30 minutos (Gifford et al., 2008).

Em média, um indivíduo adulto oxida cerca de 10 mL de álcool etílico por hora, o que corresponde a 7,9 grama por hora. Exemplificado com um indivíduo sadio de 70 kg, sem ter ingerido alimentos, que consumir 33 grama de etanol, o equivalente a 2 latas de cerveja, terá uma alcoolemia de 0,7 g/L e será eliminada após 6 ou 7 horas (Silva; Fuchs, 2004)

A biotransformação do álcool etílico é um dos determinantes do desenvolvimento da dependência alcoólica. Estima-se que entre 50% e 60% do alcoolismo seja determinado geneticamente por influência do polimorfismo nos sistemas de oxidação. Estudos recentes sugerem que existe uma relação entre as variáveis genéticas de receptores gabaérgicos, principalmente o ácido gama-aminobutírico A (GABA-A), e a incidência de alcoolismo. Tanto a enzima aldeído desidrogenase quanto a álcool desidrogenase também possuem isoformas que diferem entre si na velocidade e na eficiência de oxidação do acetaldeído e do álcool etílico (Edenberg, 2007; Sloan et al., 2008; Strat et al., 2008).

De acordo com a velocidade de biotransformação e o tempo em que os metabólitos tóxicos ficam circulantes, é que são determinados os principais danos celulares. Quanto maior a deficiência nessas enzimas, maior o risco do álcool etílico e do acetaldeído ficarem circulantes e agirem de maneira tóxica nos órgãos. Contudo, indivíduos com este polimorfismo tendem a ingerir menos bebidas alcoólicas, já que o aumento do acetaldeído promove várias reações desagradáveis que inclui rubor facial, vasodilatação periférica, confusão mental, náusea, cefaléia pulsante e taquicardia (Edenberg, 2007).

O polimorfismo genético para biotransformação do etanol pela ADH, ALDH e CP450 2E1 é observado de maneira acentuada em alguns grupos étnicos tanto para deficiência metabólica, reduzindo o risco de dependência como nos asiáticos (Strat et al., 2008), quanto na maior eficiência nos afro-americanos (Scott; Taylor, 2007) e índios brasileiros

(Fernandes, 2007), que assim sendo, têm maiores índices de dependência ao etanol (Gemma et al., 2006; Sloan et al., 2008).

Quando comparações entre sexo são realizadas, verifica-se que as mulheres são mais sensíveis aos efeitos do etanol, ou por menor concentração da enzima álcool desidrogenase gástrica ou pela diferença na composição bioquímica do organismo. Bagnardi et al. (2001) observaram através de uma meta-análise de 229 estudos, que o consumo de quatro doses de bebida alcoólica por dia, o equivalente neste estudo a 50 grama de etanol, eleva significativamente o risco de câncer de mama e de infertilidade, induzido pela tendência genética feminina associada as alterações hormonais provocadas pelo consumo crônico de etanol (Sampson, 1997; Sjögren et al., 2006; Augustynska et al., 2007; Seitz; Becker, 2007; Moe, 2008).

O mesmo dimorfismo sexual ocorre em ratos, com repercussões piores no gênero feminino, demonstrando maior lesão hepática (Cunningham; Van Horn, 2003), suscetibilidade à dependência (Escribano; Parra, 2007) redução da gliconeogênese (Sumida et al., 2007), maior incidência de cardiomiopatias (Fernández-Solà; Nicolás-Arfelis, 2002) e comprometimento da resposta imune (Kovacs; Messingham, 2002).

Como agente farmacológico, o etanol é um depressor do SNC. Ao contrário de outras drogas que se ligam a receptores específicos, esta substância exerce seus efeitos penetrando na membrana celular, e de certa forma, fluidificando seu arranjo primário e influenciando a liberação dos principais neurotransmissores do SNC (Zaleski et al., 2004).

O etanol também atua excitando sistemas inibitórios como os receptores específicos do GABA-A. Nos sistemas excitatórios glutamérgicos, ele age como inibidor dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (Ayesta, 2002), além de alterar diretamente os canais de cálcio voltagem dependente (Brodie et al., 2007), e indiretamente os sistemas

serotoninérgicos e adrenérgicos (Zaleski et al., 2004). O álcool etílico também estimula indiretamente a atividade opióide endógena através da liberação de encefalinas e endorfinas (Olive et al., 2001).

A resposta clínica do organismo ao álcool etílico é bastante variável. De maneira geral, quando consumido em baixa quantidade e frequência, estas bebidas não originam patologias físicas ou psíquicas em curto prazo. Amparando esta consideração, existem alguns estudos que relatam o efeito benéfico do etanol na forma de vinho tinto para o sistema cardiovascular, muitos deles, até sugerindo o consumo inferior a uma dose por dia, durante uma refeição (Berg et al., 2008).

Micaleff et al. (2007) demonstraram que o consumo de 400 mL por dia de vinho tinto, durante duas semanas, aumentou significativamente a concentração sérica de antioxidantes em indivíduos voluntários. O resveratrol é um dos componentes antioxidantes mais promissores da pesquisa com o consumo de vinho e seu uso em processos oxidativos patológicos relacionados ao malfuncionamento mitocondrial (Shin et al. 2009; Yang et al., 2009).

No entanto, estes achados devem ser seguidos com muita cautela. Sabe-se que a ingestão de etanol em longo prazo e altas doses repercute, sem exceções e de forma direta, nos sistemas orgânicos, promovendo alterações fisiológicas (Lopes; Francisconi, 1992; Bagnardi et al., 2001), comportamentais (Laranjeira et al., 2004), neurológicas (Cunha; Novaes, 2004) e nutricionais severas (Lieber, 2003).

Apoiando estes indícios, grande parte da literatura tem sugerido uma forte associação entre etanol e deficiência nutricional primária e secundária. A desnutrição primária ao consumo de etanol ocorre tanto pelos hábitos alimentares irregulares como pela perda na qualidade da dieta, agravada pela alta concentração energética presente no etanol e nas bebidas alcoólicas não acompanhadas de vitaminas e sais minerais. Estas calorias são consideradas “vazias”, pois apesar de fornecer aporte calórico de 7,1 kcal por cada grama de etanol ingerido

(superior aos 4 kcal por grama do carboidrato), não apresentam a mesma contribuição em nutrientes (Lieber, 2003; Otero; Cortés, 2008; Tujague; Keer, 2009).

A deficiência de micronutrientes acompanhada da desnutrição secundária sobrevém com frequência em pacientes alcoólicos, mesmo sem evidências de doença hepática, como resultado das complicações gastrintestinais como redução da absorção, insuficiência hepática, deficiência enzimática e quebra da barreira intestinal, aumentando o número de bactérias no intestino e enfraquecendo a defesa imunológica (Otero; Cortés, 2008).

A restrição na ingestão protéica também reduz os níveis hepáticos de ADH, o que leva à redução na biotransformação do etanol e, por consequência, sua maior permanência na circulação. A deficiência de zinco e magnésio no alcoolismo altera as funções hipotalâmicas, com estímulo serotoninérgico e elevação de citocinas, como o fator de necrose tumoral e interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) (Maio et al., 2000; Simsek et al., 2005; Otero; Cortés, 2008).

A redução na absorção de vitaminas e minerais reflete diretamente na manutenção da saúde geral de um indivíduo. A baixa biodisponibilidade destes nutrientes é capaz de alterar, em cadeia, todo o estado nutricional de um indivíduo. O cálcio, mineral essencial ao organismo é obtido somente através da dieta. Este micronutriente é o quinto elemento mineral mais encontrado no organismo, aproximadamente 1.000 a 1.500 grama, mantendo seu equilíbrio na faixa de 8,5 a 10,5 mg/dL de sangue, o que representa menos de 0,1% do cálcio extracelular (Ilich; Kerstetter, 2000; Heaney, 2006; Talmage; Talmage, 2006; Moe, 2008).

Em condições normais, somente 1% do cálcio encontra-se no fluído extracelular e nos tecidos moles, atuando na formação de fosfolipídios das membranas celulares, na manutenção do potencial de ação, na divisão celular e em várias outras atividades enzimáticas, sendo

que o restante (99%) é distribuído no esqueleto e dentes, na forma de hidroxiapatita (Ilich; Kerstetter, 2000; Nelson; Cox, 2004).

O cálcio é absorvido, de forma equilibrada, via transporte passivo e ativo no intestino, necessitando do seu bom funcionamento para que haja uma absorção satisfatória. A distribuição do cálcio no sangue está fisiologicamente contrabalanceada entre a forma iônica livre (45%), ligado a albumina (40%) e os 15% restantes, ligado a íons diversos como bicarbonato, citrato, fosfato e lactato (Heaney, 2006; Moe, 2008; Stránský; Ryšavá, 2009).

Os hormônios da paratireóide (PTH) e o hormônio calciferol, formado a partir da vitamina D, regulam a absorção ativa de cálcio. O prejuízo na função renal como a idade, o alcoolismo e a falta de estrógenos na pós-menopausa alteram a produção de calciferol renal e, por consequência, a absorção de cálcio. O cálcio plasmático também pode ser modificado de acordo com a concentração de albumina, anomalias protéicas e distúrbios do equilíbrio ácido-básico (Heaney, 2006; Iwaniec et al., 2008; Moe, 2008).

Assim como em patologias ósseas, também é observada uma redução plasmática de cálcio no alcoolismo crônico. Estudos em ratas demonstraram uma redução dose-dependente e duradoura dos níveis de cálcio no sangue associados ao consumo de etanol, sugerindo que a resposta hormonal de regulação deste mineral é afetada pelo etanol e que, possivelmente, reflita na formação óssea (Kayath et al., 1999; Keiver et al., 2005).

Money et al. (1989) e mais tarde, Pepersack et al. (1992), observaram que o consumo crônico de etanol induziu a inibição aguda do efluxo de cálcio do osso para o plasma, o aumento da depuração renal da hidroxiprolina e a redução da osteocalcina, sugerindo que estas alterações são indícios das anormalidades provocadas no tecido ósseo.

O fósforo é outro mineral de relevância na manutenção da qualidade óssea. Do mesmo modo, atua no metabolismo mitocondrial, na

membrana fosfolipídica, na sinalização celular, e na agregação plaquetária. A absorção do fósforo ocorre especialmente no jejuno (60%) via processo passivo ou por processo ativo estimulado pelo calciferol. No lúmen intestinal a absorção é modulada pela própria concentração deste mineral, que é independente de saturação, uma vez que quanto maior a concentração intestinal de fósforo, maior será sua absorção (Nelson; Cox, 2004; Shaikh et al., 2008)

Em homeostasia, os níveis de fosfato inorgânico livre (HPO_4^{-2}), que é a forma circulante estável de fósforo, mantém concentrações plasmáticas entre 2,5 a 4,5 mg/dL. Aproximadamente 85%, dos 700 g de fósforo presentes no organismo constituem a hidroxiapatita dos ossos e dentes, e somente 0,15% está na forma livre no plasma, ou como componente dos eritrócitos (Koshihara et al., 2005; Moe, 2008).

O mecanismo de retroalimentação do PTH controla a liberação hormonal e a reabsorção de fosfato e cálcio, para evitar perdas ósseas, alterações renais, calcificação cardiovascular ou dos tecidos moles. Em resposta à hipocalcemia, a paratireóide secreta PTH que age no túbulo distal renal restringindo a eliminação de cálcio e inibindo, nos túbulos proximais, a reabsorção de fosfato (Quarles, 2008).

Uma quantidade equivalente a 60% do fosfato absorvido é eliminada pelo rim dependendo primordialmente da atividade física, de outros constituintes da dieta, da ação hormonal e do consumo de etanol. A baixa ingestão de alimentos, a síndrome de má absorção, bem como o desequilíbrio da depuração renal de cálcio e fósforo observado no alcoolismo, prejudicam o equilíbrio sistêmico deste mineral (Kanis et al., 2005; Moe, 2008).

Estudos têm demonstrado, da mesma maneira, a associação entre a ingestão de etanol e a redução da deposição óssea de cálcio mediada pelo hipoparatiroidismo transitório, desencadeada pela atividade parácrina do PTH nos ossos (Callaci et al., 2006), que por sua

vez é regulado pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e que também está reduzido no alcoolismo crônico (Iwaniec et al., 2008).

Dentre vários sintomas do hipoparatiroidismo, como fraqueza, espasmos e câibras musculares, a hipotensão ortostática transitória, apesar de incomum, torna-se um achado clínico relevante em pacientes alcoólicos e idosos, onde a incidência de quedas relacionadas a este sintoma chega a 34% dos casos (Callaci et al., 2006; Low, 2008).

Além disso, o etanol também provoca outras alterações neurológicas relacionadas ao risco de quedas, como o enfraquecimento vestibular e somatossensorial, que regulam o equilíbrio postural e de marcha do indivíduo. Estudos em psicotoxicologia indicam que alcoolemia acima de 0,8 g/kg é responsável pela redução cognitiva e psicomotora de forma expressiva, além de reduzir drasticamente o reflexo e a capacidade de processar informações (Ahmad et al., 2002; Cunha; Novaes, 2004).

Associando as alterações do funcionamento cognitivo e de reflexos geradas pelo consumo abusivo de álcool etílico à suscetibilidade a fraturas em pacientes com deficiência hormonal, pode-se pensar em uma comorbidade que acarreta um grande impacto sócio-econômico e de enorme comprometimento para saúde pública. Acrescentando a este, outro fator negativo como a idade avançada e a osteoporose, as fraturas tendem a ter um tempo maior de reparo e as manifestações clínicas o pior prognóstico (Christodoulou; 2003; Close et al., 2003; Baum; Peters, 2008).

Dos tipos de lesão óssea provocadas por quedas ou acidentes, a fratura de quadril é o mais severo, com elevadas taxas de morbidade e mortalidade entre pacientes idosos (Pinto Neto et al., 2002; Rigo et al.; 2005). O estudo PROFET "*Prevention of falls in the elderly trial*" conduzido na Inglaterra por Close et al. (2003), revelou que o consumo de álcool etílico está entre os seis maiores responsáveis por quedas em idosos.

No Mundo, são mais de 200 milhões de indivíduos idosos com osteoporose. No Brasil ela atinge 10 milhões de pessoas, ou seja, um em cada 17 habitantes (Pastore, 2000). Em uma projeção realizada pela OMS para 2025 inclui o Brasil entre os dez países do mundo com maior contingente de idosos, e considerando-os como o maior grupo de risco para doenças crônicas não-transmissíveis, como é o caso da osteoporose (Rodrigues et al., 2008).

Estimou-se, em outro estudo epidemiológico sobre osteoporose, que a população da América Latina no ano 2000 fosse de 524 milhões de habitantes, dentre esses, quase 6% acima dos 65 anos de idade, e que até o final deste ano de 2010, o total da população Latina irá aumentar 16%, muito abaixo da taxa de idosos que crescerá 28%. De acordo com as análises e seguindo este crescimento populacional, os autores afirmam que de 1990 a 2050 o número de fraturas ósseas de indivíduos com idade de 50 a 64 anos crescerá 400% (Riera-Espinoza, 2009).

Poucas patologias foram tão estudadas e continuam tão enigmáticas quanto a osteoporose. Por definição adotada em 2000 pelo *National Institutes of Health* “osteoporose é uma desordem esquelética caracterizada pelo comprometimento da força óssea predispondo a um aumento do risco de fratura” (Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2000).

As mais recentes diretrizes sobre osteoporose elaboradas pelo *American College of Physicians*, são fundamentadas em evidências de revisões sistemáticas desde 1990 até Julho de 2007. Com base nesta metanálise, os fatores de risco para fratura relacionada à baixa densidade óssea foram a idade acima de 70 anos, índice de massa corporal menor que 25 kg/m², perda de peso maior que 10%, estilo de vida sedentário, fraturas prévias por osteoporose, uso prolongado fármacos como corticóides e dieta pobre em cálcio. Neste estudo, os autores ainda concluíram que a privação de androgênios, além de aumentar o risco de

lesão, está associada à instalação da osteoporose em homens (Baum; Peters, 2008; Qaseem et al., 2008).

A osteoporose tem sido classificada em dois tipos principais, a forma primária e a secundária. A primária, mais frequente, é subdividida em tipo I e tipo II. Na osteoporose primária tipo I ou pós-menopausa, ocorre alta reabsorção óssea em estágio precoce, com ação acentuada dos osteoclastos que afeta de forma irreversível o osso trabecular de mulheres acima dos 50 anos com hipoestrogenismo. Já a tipo II, osteoporose senil, acomete homens e mulheres acima dos 70 anos. Neste caso, a perda óssea ocorre de forma mais gradual, sugerindo uma atividade reduzida dos osteoblastos, aumento do PTH, deficiência crônica de minerais como cálcio, entre outros fatores. Como consequência da diminuição da função osteoblástica e aumento da reabsorção osteoclástica, o diâmetro periosteal aumenta, resultando em afinamento da cortical (Ramalho; Lazaretti-Castro, 1999; Gali, 2001; Lerner, 2006).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da osteoporose secundária, decorrente principalmente de processos inflamatórios e alterações endócrinas, destacam-se o hipogonadismo, desordens na tireóide, menopausa precoce, idade avançada, terapia com corticosteróides por mais de três meses, tabagismo e o alcoolismo (Gali, 2001; Sampson, 2002; Lane, 2006; Liu et al., 2008; Metcalfe, 2008; Moayyeri et al., 2009; Pinheiro et al., 2009).

Acredita-se que o consumo crônico de etanol conduz à perda óssea sistemática por redução na ingestão de nutrientes, pela ação antiproliferativa nos osteoblastos e indução da atividade dos osteoclastos (Turner; Sibonga, 2001; Callaci et al., 2004). Suportando esta hipótese, foi demonstrado em camundongos submetidos à dieta hidroalcoólica a 26% durante 4 meses, que apesar destes animais não apresentarem alteração hepática e hormonal, tiveram uma redução significativa na densidade mineral óssea (DMO) e na quantidade e espessura de trabéculas ósseas,

além da osteoclastogênese aumentada (Dai et al., 2000; Chakkalakal et al., 2005).

O osso, apesar de ser um material rígido, está em constante remodelação e, justamente por isso, torna-se sensível às mudanças nas suas atividades celulares. É também considerado um tecido viscoelástico, anisotrópico e de estrutura não homogênea. Representando 18% dos constituintes totais do corpo adulto comparado a 43% de músculos, 25% de pele e gordura, 11% de vísceras e 3% de tecido nervoso. Está associado primariamente à proteção de órgãos, sustentação e alavanca para execução dos movimentos (Witson, 2001; Junqueira; Carneiro, 2009).

Macroscopicamente e do ponto de vista estrutural, são distinguidos dois tipos de tecido ósseo, o cortical e o trabecular. Ambos formados pelos mesmos tipos de células e componentes intercelulares, diferenciando quanto à disposição espacial e a delimitação do espaço medular. A medula óssea preenche o espaço medular contido na diáfise de ossos longos, assim como os espaços inter-trabeculares. É constituída por estroma, tecido mielóide, adipócitos, vasos sanguíneos e tecido linfático. (Loveridge, 1999; Alexander, 2001).

O osso trabecular é uma estrutura altamente porosa, mais presente nos corpos vertebrais e nas extremidades de ossos longos. Neste tipo de arranjo ósseo, os espaços medulares são mais amplos e dispostos irregularmente. Além disso, é formado por trabéculas entrecruzadas de diversas formas e espessuras e dispostas de acordo com as solicitações biomecânicas, que delimitam o espaço preenchido por medula óssea. Quando há perda trabecular, ocorre igualmente a perda da qualidade óssea, comprometendo a resistência óssea e aumentando o risco de fraturas. Já o osso cortical é uma massa óssea contínua e mais densa que quando comparado ao trabecular. A cortical óssea, mais localizada na diáfise e metáfise de ossos longos. Pode ser

considerado como uma estrutura mais compacta e de canais mais estreitos (Loveridge, 1999; Carbonare et al., 2005; Turner, 2007).

Microscopicamente, o tecido ósseo é composto por células, água e a matriz extracelular dispostas tridimensionalmente. Dentre os componentes celulares estão os osteócitos, que participam da manutenção da matriz; os osteoblastos, os osteoclastos, além de adipócitos, nos indivíduos adultos (Loveridge, 1999; Junqueira; Carneiro, 2009).

No processo de remodelação normal dos ossos, os osteoblastos e os osteoclastos trabalham de forma conjunta, com o objetivo de substituir o tecido ósseo senil, reorganizar o arranjo celular e manter a homeostasia mineral e adaptar a microarquitetura óssea à solicitação biomecânica. Os osteoclastos secretam ácidos, colagenases, pirofosfatases e outras enzimas que descalcificam e hidrolisam a matriz orgânica. Os osteoblastos através da sua atividade anabólica sintetizam colágeno e proteínas que são depositadas na superfície para formar a matriz óssea. (Hazenbergh et al., 2007; Henriksen et al., 2007).

A matriz extracelular do osso é formada por duas fases, uma orgânica composta por colágeno, glicosaminoglicanos e uma inorgânica de cristais de fosfato de cálcio. A porção inorgânica constitui 67% do volume ósseo, e é composta por cristais de cálcio e fosfato na forma de hidroxiapatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ e fosfato de cálcio não cristalino. Nesta matriz, há também outros íons como citratos, bicarbonato, fluoreto, magnésio, potássio e sódio em menor quantidade (Witson, 2001; Wahl; Czernuszka, 2006; Clarke, 2008).

Os cristais de hidroxiapatita situam-se ao lado de cada fibra colágena presentes nos osteóides, firmemente fixados, formando um padrão ordenado ao longo do osso. Os cristais são envolvidos por um meio homogêneo designado substância fundamental amorfa, composta de líquido extracelular e proteoglicanos, sulfato de condroitina e ácido hialurônico (Feng, 2009; Junqueira; Carneiro, 2009).

Em nível molecular, a porção orgânica é constituída em 90% do seu volume por colágeno tipo I e 10% por proteínas não colágenas. O colágeno tipo I além de ser a proteína extracelular mais abundante, é essencial para a força esquelética. Cada fibra colágena se estende em torno das linhas de força tensionais, proporcionando ao osso certa elasticidade (Rupel et al., 2008).

O colágeno, que compreende a porção orgânica na matriz extracelular possui 35% de glicina, 11% de alanina e 21% de prolina e hidroxiprolina. Nos animais existe cerca de 20 tipos distintos de colágeno, cada um com sua característica e funções específicas. O conjunto de eventos extra e intracelulares, como por exemplo, a resposta ao estímulo hormonal, determina o controle da biossíntese do colágeno ósseo. De outra forma, o aumento da síntese de colágeno pode ser determinado pela resposta dos fibroblastos e das fibras colágenas à ação do acetaldeído gerado na biossíntese do etanol (Lieber et al., 1965; Lieber 2004; Kolácná et al., 2007; Lodi et al., 2009).

Assim como os micronutrientes e o tecido ósseo são influenciados pelo consumo de álcool etílico, este também pode interferir diretamente na função reprodutiva feminina ou masculina via sistema hormonal e, indiretamente, pelas alterações na aromatização hepática precursora de estrógenos (Turner et al., 1999; Augustynska et al., 2007; Epstein et al., 2007; Manolagas et al., 2009).

Como função metabólica, os ossos também desempenham um papel importante no controle bioquímico de alguns íons como cálcio e fosfato. Na fisiologia normal, há um intercâmbio contínuo entre o cálcio plasmático e aquele armazenado no esqueleto, sendo primordial para a condução nervosa, contração muscular, coagulação sanguínea e basicamente toda a atividade celular de ossos e dentes. A homeostasia óssea é refletida no sangue e na urina com alteração dos níveis de enzimas, minerais e outras substâncias

envolvidas na remodelação óssea (Pinto Neto et al., 2002; Heaney, 2006; Moe, 2008).

Acredita-se que além do hormônio paratireoidiano, calcitonina e hormônio de crescimento, os esteróides sexuais exerçam sua função metabólica nos ossos atuando no processo de remodelação. Do mesmo modo, a etapa final da síntese de estrógeno é catalisada pelo CYP450 no fígado, e tanto animais machos quanto fêmeas, com deleção do gene que participa desta biossíntese, têm a produção de estrógeno impedida (Faloni; Cerri, 2007; Ignacio et al., 2009).

O hipoestrogenismo exerce um efeito direto sobre a atividade osteoclástica, aumentando as interleucinas IL-1 e IL-6 e as citocinas pró-inflamatórias, que estimulam a liberação do RANK ligante (receptor do ativador do fator nuclear Kappa B), proteína pertencente à família do fator de necrose tumoral, que é um dos principais agentes promotores da osteoclastogênese. Esta outra via de atuação dos estrógenos no processo de remodelação óssea, constitui um dos fatores de inibição da apoptose de osteoclastos e da diferenciação e ativação destas células. Já a osteoprotegerina é outra proteína solúvel que age como um receptor competitivo ao RANK ligante. Desta forma, na deficiência estrogênica há aumento da expressão de RANK ligante e redução da osteoprotegerina (Ramalho et al., 2000; Lerner, 2006; Faloni; Cerri, 2007).

Com a menopausa e a andropausa, as concentrações de estrógenos declinam drasticamente, possibilitando a hiperatividade osteoclástica, como consequência, há o desequilíbrio na remodelação óssea com tendência à desmineralização. Por outro lado, através da terapia de reposição estrogênica, é possível impedir a degradação da matriz óssea (Turner; Sibonga, 2001; Faloni; Cerri, 2007).

Os ovários são a principal fonte fisiológica de estrógeno circulante, sendo secretado na forma de estradiol. O hormônio estrogênico influencia a diferenciação de células progenitoras

hematopoiéticas em osteoclastos, participa da regulação e remodelação óssea, além de atuar no metabolismo do cálcio no osso cortical e trabecular (Gennari et al., 2002; Harada; Rodan, 2003).

De acordo com dados da literatura, fica claro que a concentração de hormônios esteróides sexuais reduz com o passar da idade em ambos os gêneros, privando o indivíduo do efeito protetor contra a reabsorção óssea. Estima-se que 50% da perda óssea relacionada à carência de estrógeno, ocorra nos dez anos seguintes à instalação da menopausa (Ilich; Kerstetter, 2000; Ramalho et al., 2000; Gennari et al., 2003).

Do mesmo modo já foi demonstrado que a suscetibilidade às fraturas osteoporóticas em mulheres idosas aumenta com a idade, e ao atingir a menopausa, há uma aceleração ainda mais significativa, com elevação da perda óssea e alteração da microarquitetura e conectividade trabecular (Jiang et al., 2007; Seeman, 2008).

O estrógeno também regula a expressão dos genes que codificam o colágeno tipo I nos osteoblastos, a fosfatase alcalina óssea, e a osteocalcina. Ele inibe a síntese de agentes reabsortivos como as interleucinas, o fator de necrose tumoral alfa, a prostaglandina E₂ e o fator estimulador de colônia de macrófagos, alterando, do mesmo modo, a osteoclastogênese (Bland, 2000; Okazaki et al., 2002). Dentre as interleucinas inibidas pelo estrógeno, destacam-se a IL-1 e IL-6 produzidas nos osteoblastos, que aumentam a reabsorção óssea quando há deficiência hormonal (Sunyer et al., 1999, Ribeiro et al., 2003; Lorenzo et al., 2008).

Simsek et al. (2003) demonstraram através de inibição hormonal por ovariectomia e orquiectomia em ratos, o aumento transitório na osteoclastogênese em apenas uma semana após a cirurgia.

A importância da ação hormonal nos diferentes gêneros e de acordo com o estímulo do desenvolvimento cortical ou trabecular, também foi observada em animais experimentais. Receptores andrógenos

ativados isoladamente estimulam o desenvolvimento trabecular e a remodelação cortical normal em camundongos machos. Todavia, a expansão do periósteo nestes animais, é observada somente quando há ativação simultânea dos receptores de andrógeno e estrógeno (Vanderschueren et al., 2004; Epstein, 2007).

No gênero masculino, além do efeito estrogênico, os ossos são igualmente afetados pelos hormônios andrógenos como a testosterona e seus derivados 5 alfa-reduzido e a dihidrotestosterona, produzidos nas gônadas, que secretam mais de 95% do total de testosterona nos homens (Veloso et al., 2008). Estes hormônios, além de manterem o tônus muscular masculino, regulam o metabolismo ósseo via receptor específico para andrógenos e via receptor de estrógenos após a aromatização nos hepatócitos. Deste modo, a osteoporose em homens acima dos 55 anos está relacionada com o equilíbrio do sistema hipotálamo-pituitária-gonadal, que por sua vez, atua na regulação do estrógeno e da testosterona (Gennari et al., 2003; Lee et al., 2006; Madeo et al., 2007; Ohlsson; Vandenput; 2009).

Estima-se que 30% dos homens acima dos 60 anos tenham redução na concentração de testosterona. Habitualmente, os níveis declinam com a idade em uma taxa média de 1,5% ao ano, chegando a níveis 20% menores aos 50 anos e decrescendo até 50% aos 80 anos. As implicações desta redução hormonal refletem também nas doenças pré-existentes do indivíduo, elevando o índice de mortalidade em 6 meses quando são comparados homens com as mesmas patologias e idade (Shores et al., 2006; Laughlin et al., 2008).

Laughlin et al. (2008) conduziram uma grande pesquisa populacional, onde foram avaliados 1060 homens, segundo a idade, patologias prévias, parâmetros antropométricos e 19 variáveis bioquímicas. Neste estudo os pesquisadores constataram que ao atingir níveis de testosterona abaixo do normal, a mortalidade nos pacientes

para os 20 anos seguintes à redução hormonal aumentava em 40%, independente da causa do óbito.

Baixas concentrações de testosterona provocam redução da massa muscular, aumento de gordura corporal, obesidade centrípeta, resistência insulínica, irritabilidade e redução da libido. A privação deste hormônio precocemente, também reduz o crescimento periosteal e crescimento radial, resultando em tronco e membros menores nos machos e com tendência a maior fragilidade quando submetidos a cargas mecânicas. Contudo, não é possível relacionar a andropausa com a perda óssea acelerada, como é observada nas mulheres pós-menopausa. Neste caso, a redução da DMO é mais lenta, cerca de 20 a 25% de osso cortical e trabecular (Ribeiro et al. 2003; Shores et al., 2006; Epstein, 2007).

Vanderschueren et al. (2000) conduziu um estudo com ratos Wistar orquiectomizados durante 15 semanas, e observou que a reposição hormonal de baixas doses de testosterona preveniu a redução da densidade mineral e da massa óssea. Os autores ainda verificaram que o efeito da testosterona ocorre mais na redução da reabsorção óssea do que no estímulo de neoformação óssea.

A testosterona, por sua vez, pode ser convertida pela aromatase em estrógeno, e desta forma estimular a formação óssea tanto em machos quanto em fêmeas. A enzima aromatase é dependente do citocromo P450 do fígado, e por esta razão, uma alteração hepática como ocorre no alcoolismo, pode refletir na inibição da síntese estrogênica e elevação da suscetibilidade à fraturas (Harada; Rodan, 2003; Ohlsson; Vandenput; 2009).

Mecanicamente, o tecido ósseo comporta-se como outros materiais não-biológicos, pois pode sofrer micro-traumas e fraturas. Quando estes micro-traumas excedem a capacidade reparativa do osso ocorre a falha (Nalla et al., 2004). A alta concentração de colágeno da fase orgânica em ossos jovens e normais permite ao osso resistir a tensões de flexão. Já a fase inorgânica, compostas por cristais de

hidroxiapatita, dá ao osso excelente resistência às tensões de compressão (Eihorn, 1992; Alexander, 2001).

A redução da espessura, as irregularidades do osso trabecular ou cortical e as microfraturas, reduzem a capacidade do osso em absorver energia após um impacto, resultando em fratura mesmo sob condições normais de carga. A resistência óssea reflete a integração das duas características principais do osso que são a densidade óssea e qualidade óssea (Downey; Siegel, 2006; Hernandez, 2008).

Dentre as funções mecânicas, os osteócitos atuam como células sensoriomecânicas, transformando os estímulos mecânicos recebidos sobre o esqueleto, em sinais bioquímicos de ativação da remodelação óssea e deposição mineral (Ocarino et al., 2006; Lane; Yao, 2009). O envelhecimento é um dos fatores de redução na quantidade e atividade dos osteócitos. Os osteoclastos, também atraídos por células em apoptose aumentam, ainda mais, a reabsorção óssea em idosos. Da mesma forma, a porção colágena sofre grandes perdas no decorrer da idade, acentuando-se após a menopausa (Bronckers et al., 2000; Bay-Jensen et al., 2009).

Em seus estudos Hogan e colaboradores (2001), verificaram em roedores que o consumo de etanol também promove redução dramática das propriedades biomecânicas do fêmur quando comparados a ratos não submetidos ao consumo crônico de álcool etílico.

Desde que Julius Wolff formulou a “Lei da Remodelação Óssea” em 1892, estudar o comportamento do tecido ósseo frente à patologias como desnutrição, alcoolismo e menopausa tem sido um grande desafio da comunidade científica (Burger; Klein-Nulend, 1999; Cole et al., 2009).

Por meio de ensaios destrutivos específicos tem sido possível determinar algumas propriedades biomecânicas de um material biológico como o osso, tanto na forma de corpo de prova quanto na sua

estrutura íntegra, sendo estas, denominadas propriedades biomecânicas intrínsecas e extrínsecas (Turner; Burr, 1993; Ammann; Rizzoli, 2003).

As propriedades extrínsecas referem-se ao osso como um todo, refletindo em seus valores os efeitos combinados do tamanho, forma e características teciduais. O uso do osso intacto é de grande importância no entendimento da fisiopatologia, pois os resultados obtidos refletem melhor a capacidade plástica e de resistir ao esforço de movimento do sistema músculo-esquelético. Já as propriedades intrínsecas referem-se ao comportamento do material somente a nível tecidual (Burger; Klein-Nulend, 1999; Silva, 2007).

Parâmetros obtidos através de ensaios clássicos de propriedades biomecânicas, como carga máxima (carga máxima aplicada no momento da fratura óssea), deformação (distância movida pela carga até o momento da fratura), rigidez (curva relacionando carga e deformidade) e capacidade de absorção de energia (área sobre a curva), são importantes para especificar as propriedades elásticas e rígidas do osso (Hernandez; Keaveny, 2006; Comelekoglu et al., 2007; Silva, 2007; Ruppel et al., 2008).

Os ensaios biomecânicos que determinam estes parâmetros são classificados de acordo com a forma e a direção das cargas aplicadas. As cargas aplicadas, por unidade de área de osso, podem ser classificadas de acordo com forma de aplicação das tensões sendo a tração, a compressão, o cisalhamento, a flexão e a torção as técnicas mais comuns (Eihorn, 1992; Turner; Burr, 1993; Hernandez; Keaveny, 2006; Ruppel et al., 2008).

Os avanços das técnicas analíticas sem dúvida favoreceram o desenvolvimento das análises ósseas. Contudo, para a qualidade dos resultados em estudos científicos, é imperioso o uso de métodos distintos e parâmetros diferenciados de análise. Quanto mais correlações são encontradas, mais suporte é dado às evidências descritas. Da mesma forma, maior será a contribuição da pesquisa na

determinação das possibilidades diagnósticas e futuras abordagens terapêuticas (Ammann; Rizzoli, 2003; Comelekoglu et al., 2007; Cole et al., 2009).

Atualmente é preconizado pela OMS e seguido por protocolos clínicos do mundo toda a utilização da absorciometria de dupla emissão de raios-x (dual energy x-ray absorptiometry - DEXA) como técnica padrão-ouro para medida da massa óssea e no diagnóstico de osteoporose. Esta técnica determina quantitativamente o valor da DMO do indivíduo através de análise na coluna vertebral dorso-lombar, no terço proximal do fêmur, no terço distal do rádio e no terço proximal do úmero, locais correspondentes ao maior índice de fraturas por fragilidade óssea e por consequência, os mais importantes para serem investigados (Junqueira et al., 2001; Pinto Neto et al., 2002; Qaseem et al., 2008).

Apesar disso, estudos populacionais demonstram que a quantificação da massa óssea não permite explicar todos os fenômenos associados à osteoporose (Wilkin; Devendra, 2001). Entre eles, o fato de 50% dos casos de fraturas ósseas ocorrerem em casos não qualificados na classificação de osteoporose da OMS (Schuit et al., 2004). Do mesmo modo, estudo experimental de Sarkar et al. (2002) e metanálise realizada por Delmas et al. (2004) demonstraram que a terapêutica com fármacos anti-reabsortivos como o raloxifeno promove, em média, a redução de 50 a 60% e pelas análises com DEXA, ocorre o aumento de apenas 7 a 8% na medida de DMO.

Estes resultados levam a acreditar que os métodos tradicionalmente empregados para determinar a qualidade do osso fornecem somente uma visão semi-quantitativa destes processos, não sendo possível qualificar as alterações ultra-estruturais e moleculares das amostras ou mesmo prever novas fraturas. Assim sendo, o desenvolvimento de novos métodos de avaliação óssea podem permitir a identificação e a quantificação destas alterações de forma mais global (Nagareddy et al., 2005; Hernandez; Keaveny, 2006; Briggs et al., 2007).

Associado ao DEXA acredita-se que alguns marcadores bioquímicos auxiliam tanto no diagnóstico diferencial quanto na determinação do grau de comprometimento ósseo. Níveis plasmáticos de cálcio e fosfato inorgânico são alguns destes indicativos, uma vez que estes minerais compõem a estrutura da hidroxiapatita e suas alterações refletem na qualidade da microarquitetura óssea (Pinto Neto et al., 2002; Saraiva; Lazzareti-Castro, 2002; Keiver, 2004; Vieira, 2007; Vasikaran, 2008).

Para mensuração destes minerais também é possível utilizar métodos de alta sensibilidade analítica como espectroscopia por fluorescência de raios-x, tomografia computadorizada quantitativa, microscopia eletrônica de varredura, entre outros (Baranowska et al., 2004; Nagareddy; Lakshmara, 2005).

Dentre estas técnicas analíticas de elevada exatidão, a microfluorescência de raios-x (μ EDXRF; *micro energy dispersive x-ray fluorescence*) é uma variante microanalítica da fluorescência de raios-x por dispersão em energia (EDXRF; *energy dispersive x-ray fluorescence*), que utiliza um micro-feixe para incidir os raios-x na amostra, possibilitando o mapeamento e a análise elementar de uma área específica menor da amostra. A microfluorescência de raios-x permite a determinação simultânea ou sequencial da concentração elementar da ordem de parte por milhão (ppm), sem a necessidade de pré-tratamento químico ou destruição da amostra (Nagata et al., 2001; Baranowska et al., 2004; Oliveira et al., 2008).

Esta técnica baseia-se na excitação da amostra por um feixe primário proveniente de um tubo de raios-x, excitando os elétrons e gerando uma perturbação nos orbitais eletrônicos dos átomos. Esta perturbação atômica provoca uma fotoejeção de elétrons, formando as lacunas e gerando uma instabilidade. Na sequência, os elétrons das camadas posteriores realizam um salto quântico e ocupam estas lacunas geradas. Essa transição eletrônica promove a perda de energia e tende a

estabilizar os orbitais e atingir o estado fundamental. O resultado desta movimentação de elétrons é a emissão, na forma de fóton de raios-x, de energia característica e bem definida para cada elemento constituinte da amostra. Este efeito é esquematizado no diagrama da figura 1 (Zamburlini et al., 2007; Carvalho et al., 2009).

Para medir a energia emitida pela amostra, o espectrômetro identifica o número de fótons (intensidade) da radiação fluorescente (secundária) em função da sua energia. A intensidade da radiação secundária é diretamente proporcional à concentração de cada elemento químico da amostra (Todd; Chettle, 1994; Matsumoto, 2001; Nagata et al., 2001; Soares et al., 2009).

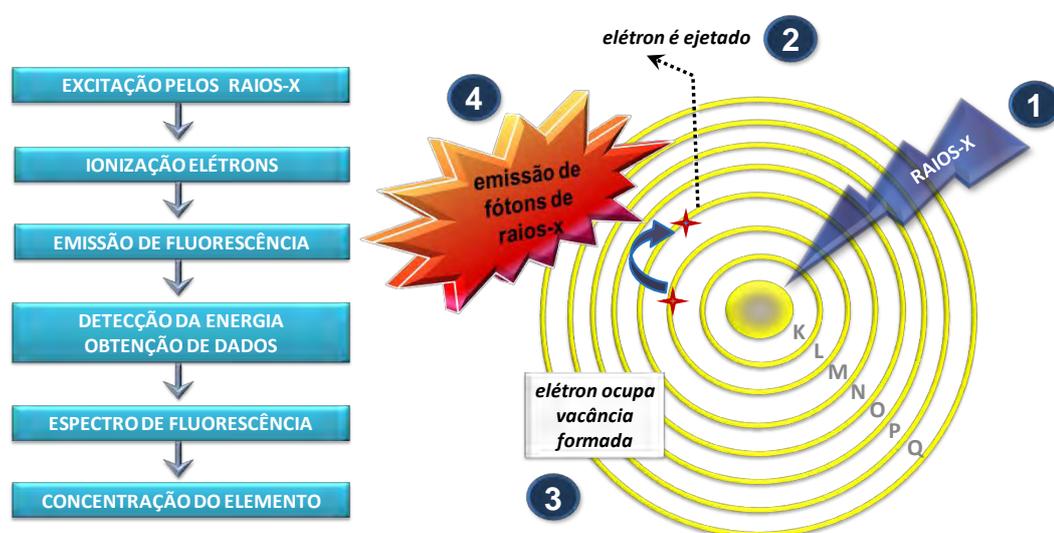


Figura 1 - Diagrama de obtenção do espectro de fluorescência de raios-x.

Através da verificação em diferentes escalas, é possível obter uma visão geral e molecular de grande relevância no entendimento das estruturas ósseas, partindo da avaliação macroscópica para o nível molecular e correlacionando com outras análises, como é o caso dos testes biomecânicos (Lane; Yao, 2009).

Diante da complexidade de interação entre as patologias, e do elevado risco de um indivíduo alcoolizado sofrer uma queda, torna o

problema da osteoporose associada ao alcoolismo um objeto de extrema relevância, uma vez que as fraturas interferem na qualidade e na expectativa de vida. Sendo assim, este trabalho se propõe a estudar as alterações biomecânicas ósseas, bem como o cálcio e fósforo no sangue e no fêmur de ratos com deficiência hormonal submetidos ao consumo crônico de etanol.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta desta pesquisa foi avaliar a resposta biomecânica decorrente da deficiência hormonal e do consumo elevado e crônico de etanol sobre o fêmur de ratos, bem como os parâmetros bioquímicos no sangue e técnicas microanalíticas da mineralização óssea.

3.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a condição nutricional dos ratos frente às variáveis estudadas,
- b) Analisar o comportamento biomecânico estrutural dos fêmures de ratos, quando submetidos ao ensaio de flexão-compressão em 3 pontos,
- c) Quantificar e analisar, por meio de testes bioquímicos o cálcio e o fosfato inorgânico,
- d) Quantificar e analisar, por meio de espectrometria de microfluorescência de raios-x o cálcio e o fósforo dos fêmures,
- e) Correlacionar os achados de acordo com o gênero, tipo de dieta e tipo de cirurgia.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Animais

Este estudo seguiu os preceitos éticos de experimentação animal, conforme o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo experimental desenvolvido neste trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão De Ética em Experimentação Animal sob protocolo número 037/2007-PA/CEP.

Para a realização deste trabalho foram utilizados 108 ratos adultos, sendo 54 machos (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar) e 54 fêmeas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, Wistar), com aproximadamente cento e vinte dias de idade (4 meses) e massa corpórea média de 267 grama para fêmeas e 446 grama para machos, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP. Os animais foram mantidos em trios em gaiolas a temperatura ambiente e higienizadas diariamente.

4.2 Protocolo experimental

Os animais foram divididos em 12 grupos (cada grupo contendo 9 ratos), de acordo com o gênero, tipo de cirurgia e dieta ministrada, conforme esquema descrito nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Grupos experimentais de ratas fêmeas

Grupos n=9	Cirurgia	Dieta
G1	Ovariectomia	Etanol
G2	Ovariectomia	Isocalórico
G3	Ovariectomia	<i>Ad libitum</i>
G4	Sham	Etanol
G5	Sham	Isocalórico
G6	Sham	<i>Ad libitum</i>

Tabela 2 - Grupos experimentais de ratos machos

Grupos n=9	Cirurgia	Dieta
G7	Orquiectomia	Etanol
G8	Orquiectomia	Isocalórico
G9	Orquiectomia	<i>Ad libitum</i>
G10	Sham	Etanol
G11	Sham	Isocalórico
G12	Sham	<i>Ad libitum</i>

4.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental está esquematizado conforme a figura 2, mostrando o tempo inicial e final do tratamento em semanas.

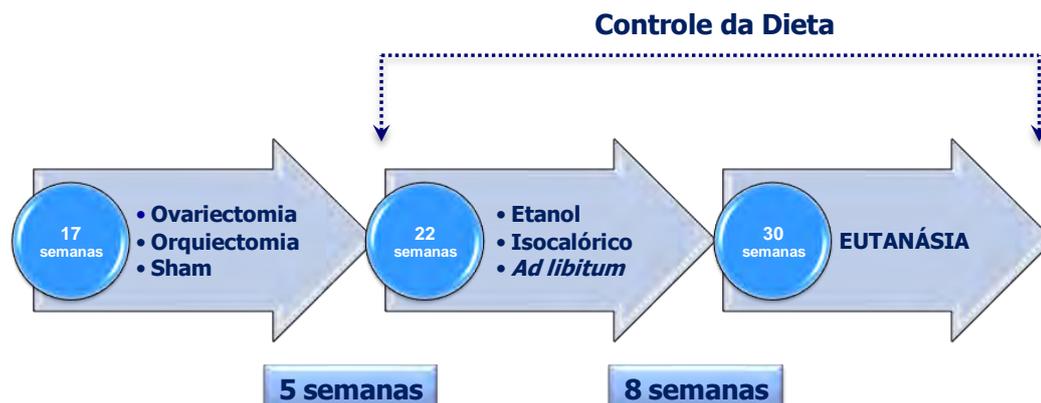


Figura 2 – Delineamento experimental

4.4 Dieta

O modelo de alcoolismo utilizado foi o modelo semi-voluntário de Lieber-DeCarli, onde a solução hidroalcoólica era o único líquido oferecido para os grupos G1, G4, G7 e G10, e água fornecida para os grupos *ad libitum* G3, G6, G9 e G12. Além disso, foi fornecida solução de sacarose e água a vontade para os grupos isocalóricos G2, G5, G8 e G11 (Cunningham et al., 2000; Chakkalakal et al., 2002; Souza et al., 2009).

A alcoolemia de 20% e o tempo de dieta alcoólica de 8 semanas, foram baseados em observações de estudos com resultados positivos para indução da perda óssea (Hogan et al., 2001; Rocha, 2005; Deco, 2009).

A quantidade de dieta líquida e sólida consumida foi controlada diariamente em todos os grupos experimentais, sendo obtidas as calorias totais da dieta e sua proporção em relação às dietas sólida e líquida (Rocha, 2005; Alonso, 2009; Souza et al., 2009).

4.4.1 Líquida

Os animais do grupo Etanol receberam como dieta líquida uma solução hidroalcoólica contendo 5% de álcool etílico (*Gay Lussac 5°* = 5% v/v) com aumento gradativo semanal de 5% para ambientação, até atingir a concentração final de 20%, mantida por oito semanas até o final do experimento (Cunningham et al., 2000; Alonso, 2009; Deco, 2009).

Os animais dos grupos Etanol ingeriam água apenas na forma de solução hidroalcoólica que era fornecida *ad libitum* durante as 24 horas para evitar o consumo agudo e a desidratação (Deco, 2009; Dolganiuc; Szabo, 2009).

O grupo Isocalórico teve a finalidade de distinguir se o efeito prejudicial era decorrente da ação do etanol ou da desnutrição provocada pelo seu consumo crônico (Lieber, 2003; Alonso, 2009).

A fim de estabelecer o consumo pareado de calorias dos grupos Etanol e Isocalórico, o fornecimento da dieta nos grupos Etanol teve início um dia antes dos demais para que, no dia seguinte, as calorias ingeridas na forma de etanol fossem oferecidas aos grupos Isocalórico na forma de solução de sacarose (Deco, 2009; Souza et al., 2009).

O consumo diário de etanol foi convertido de grama para kcal e a quantidade correspondente foi transformada em solução de sacarose a 26,6% (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro - Brasil) e fornecida aos animais Isocalóricos. Para estes cálculos foi estabelecido que 1 grama de etanol é equivalente a 7,1kcal/g, e que 1 mL de álcool etílico absoluto PA (ACS-99,5° Ecibra®, Santo Amaro - Brasil) contém 0,798 grama de etanol.

Os grupos *ad libitum* receberam dieta líquida livre constituída de água potável, sendo as quantidades ingeridas registradas por dia e por animal.

4.4.2 Sólida

Todos os grupos receberam dieta sólida controlada, constituída pela ração Labina[®] (Purina, São Paulo - Brasil), com 23% de proteínas, conforme disposto no quadro 1.

Para os grupos Etanol foi fornecida diariamente uma quantidade livre, porém conhecida de ração. Para estabelecer o consumo pareado de calorias provenientes da ração ingerida pelos grupos Etanol, o fornecimento da dieta nestes grupos também teve início um dia antes dos demais para que, no dia seguinte, a mesma quantidade de ração fosse oferecida aos grupos Isocalórico (Deco, 2009; Souza et al., 2009). Os grupos *ad libitum* também receberam dieta sólida livres, sendo registrada a ingestão diária por animal.

Quadro 1 - Composição da dieta padrão utilizada na alimentação dos animais.

Vitamina A	20000 UI	Umidade (máx.)	13%
Vitamina D3	6000 UI	Proteína (mín.)	23%
Vitamina E	30 UI	Lípídeo (méd.)*	4,2%
Vitamina K	6 mg	Carboidrato (méd.)*	56,8%
Zinco	35 mg	Caloria (kcal/100g)*	358,5%
Cobre	26 mg	Extrato Etéreo (mín.)	2,5%
Antioxidante	100 mg	Matéria Fibrosa (máx.)	9,0%
Vitamina B12	10 µg	Matéria Mineral (máx.)	8,0%
Vitamina B2	8 mg	Cálcio (máx.)	1,3%
Pantotenato de Cálcio	24 mg	Fósforo (min.)	0,85%
Niacina	95 mg		
Tiamina	4 mg		
Colina	2000 mg		
Piridoxina	6 mg		
Biotina	0,1 mg		
Ácido Fólico	0.5 mg		
Manganês	50 mg		
Iodo	2 mg		
Ferro	65 mg		

Composição básica segundo Purina do Brasil: milho, farelo de trigo, farelo de soja, farinha de carne, farelo de arroz cru, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, sal, Pré-mix[®].

* Adaptado do rótulo do produto e de: Maia, LMSS. L-arginina facilita a depressão alastrante cortical, de forma dependente da dose, em ratos nutridos e precocemente desnutridos. 2008. Tese (Doutorado em Nutrição) - Universidade Federal de Pernambuco.

4.5 Procedimentos cirúrgicos

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados com material cirúrgico esterilizado, em sala cuidadosamente limpa, no Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP.

4.5.1 Anestesia e analgesia

Antes de todos os procedimentos cirúrgicos como ovariectomia, orquiectomia e falsa-cirurgia (Sham), os animais foram imobilizados e anestesiados por via intramuscular na dose de 0,1mL/100g de uma solução contendo 13 mg/kg de cloridrato de xilazina Anasedan[®] (Vetbrands, Paulínia – Brasil) (fármaco sedativo, relaxante muscular e analgésico), associado à 33 mg/kg de cloridrato de quetamina Dopalen[®] (Vetbrands, Paulínia - Brasil) (fármaco anestésico geral).

Após o procedimento cirúrgico, todos os animais receberam uma dose única via intramuscular de solução antimicrobiana de uso veterinário na dose de 1,35 mL/kg, contendo benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, diidroestreptomicina base sulfato e estreptomicina base sulfato em ampola de 6.000.000 UI Pentabiótico Veterinário[®] (Fort Dogde, Porto Alegre - Brasil).

Todos os animais também receberam antiinflamatório não esteroideal no músculo contralateral na dose de 1 mg/kg de diclofenaco sódico 75 mg Voltaren[®] (Novartis, Rio de Janeiro - Brasil).

4.5.2 Ovariectomia e falsa ovariectomia (Sham)

A ovariectomia foi utilizada como forma de indução de perda óssea nas ratas fêmeas. Esta técnica é um método experimentalmente consagrado e bem documentado por Jee e Yao (2001), Turner (2001), Netto et al. (2006) e Deco (2009), sendo igualmente recomendado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), órgão do governo americano que regulamenta alimentos e medicamentos (Bonjour et al., 1999).

Aos cinco meses de idade, as ratas pertencentes ao grupo ovariectomizado foram anestesiadas, tricotomizadas na região abdominal lateral e submetidas à anti-sepsia com álcool iodado a 2%.

Para a ovariectomia, os animais sofreram incisão longitudinal com extensão aproximada de 1 centímetro na pele e musculatura da região lateral do corpo, na linha média, próxima ao nível dos rins e abaixo da última costela.

O ovário foi identificado e exposto, sendo em seguida realizada a hemostasia local por meio da ligadura da parte superior da trompa com fio de seda número 4 Ethicon[®] (Johnson & Johnson, São José dos Campos - Brasil).

Em seguida, os ovários e tecidos moles adjacentes foram removidos. As trompas foram então reposicionadas na cavidade abdominal, as camadas musculares e a pele foram suturadas, em seguida foi realizada nova anti-sepsia com álcool iodado a 2% (Synth[®], Diadema - Brasil). Este procedimento foi realizado bilateralmente (Figura 3).

Para que não houvesse interferência da resposta orgânica ao trauma, todos os animais do grupo falso-ovariectomizados (Sham) foram submetidos aos mesmos protocolos que os animais ovariectomizados, porém os ovários não foram removidos (Netto et al., 2006).

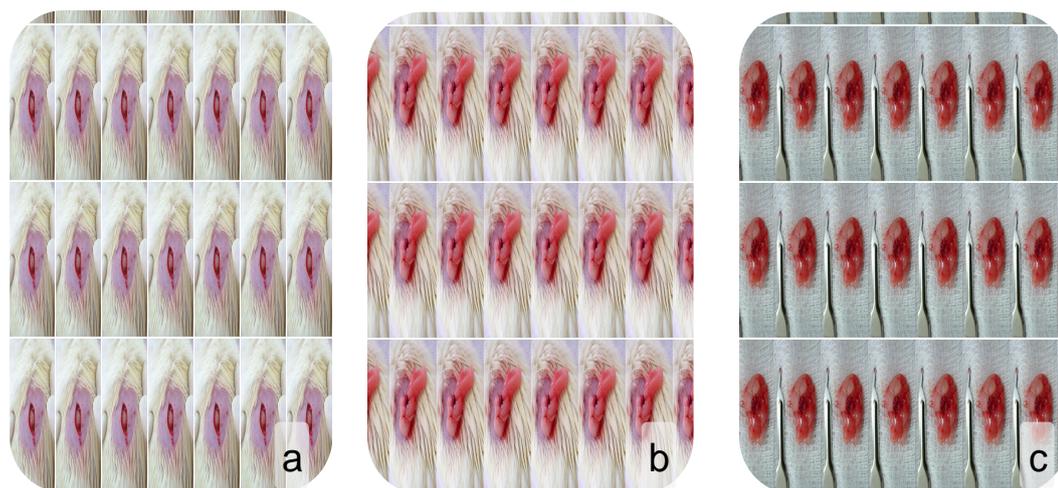


Figura 3 - Cirurgia de Ovariectomia: a) incisão da pele e da camada muscular; b) exposição do ovário e tecido mole circundante; c) ovário e tecido mole removido.

4.5.3 Orquiectomia e falsa orquiectomia (Sham)

Para indução de perda óssea nos ratos machos foi utilizada a orquiectomia, um método experimentalmente com resultados positivos para redução estrogênica em machos (Calero et al., 2000; Vanderschueren et al., 2000; Herbst; Bhasin, 2004; Piano et al., 2005; Veloso et al., 2008).

Os ratos pertencentes ao grupo orquiectomizado, após anestesia, foram dispostos em decúbito dorsal e o escroto recebeu anti-sepsia com álcool iodado a 2%.

Em seguida, a pele foi incisada longitudinalmente na linha mediana anterior da bolsa escrotal e realizada a exteriorização dos testículos. Os ductos deferentes e o pedículo vascular foram isolados, ligados com fio de seda número 4 para hemostasia, permitindo a remoção dos testículos e epidídimos (Veloso et al., 2008).

Após a remoção bilateral dos testículos, foi realizada a sutura muscular e na pele da bolsa escrotal e realizada nova anti-sepsia com álcool iodado a 2% (Figura 4).

Os animais falso-orquiectomizados (Sham) foram submetidos ao mesmo procedimento farmacológicos e ato operatório para que não houvesse interferência da resposta orgânica ao trauma cirúrgico. Entretanto, houve apenas o manuseio cirúrgico do testículo, sem remoção do órgão.

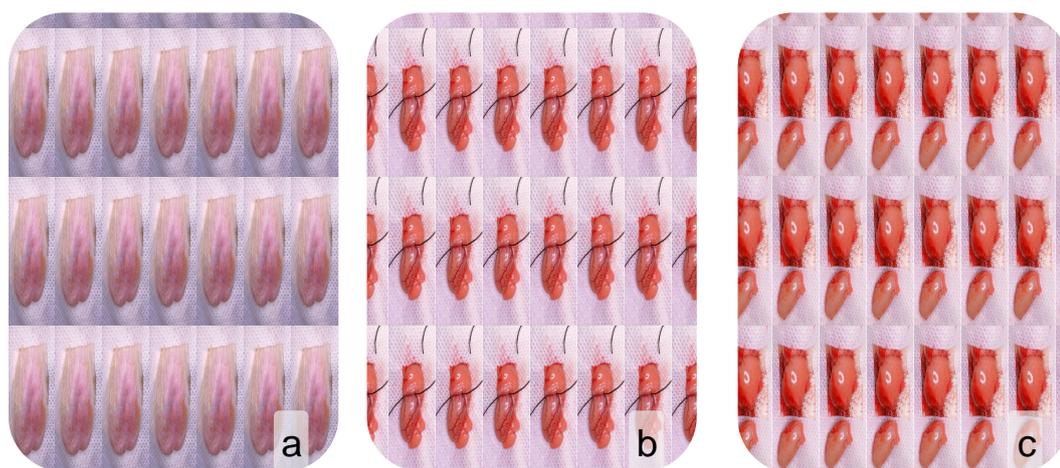


Figura 4 - Cirurgia de Orquiectomia: a) desinfecção do escroto e incisão na pele e músculo; b) ligadura do pedículo vascular; c) remoção do testículo

4.5.4. Coleta de sangue

Após as oito semanas de dieta, os animais foram novamente anestesiados e levados à sala cirúrgica para coleta de sangue e eutanásia. Para realizar as dosagens bioquímicas foram coletados aproximadamente 5 mL de sangue da artéria abdominal de cada animal.

A coleta foi realizada com auxílio de seringa de 5 mL com agulha 30x7 (Solomed[®] B.D., Juiz de Fora - Brasil) na artéria abdominal,

que foi localizada após abertura sagital do abdome e afastamento das estruturas sobrepostas à artéria (Figura 5).

As amostras foram depositadas de forma lenta em tubos de coleta previamente heparinizados. Em seguidas, as amostras foram encaminhadas para análise bioquímica de cálcio e fosfato no Laboratório de Análises Clínicas Oswaldo Cruz[®] de São José dos Campos/São Paulo.



Figura 5- Coleta do sangue pela artéria abdominal.

4.5.5 Eutanásia

Imediatamente após a coleta de sangue todos os animais, foram decapitados em guilhotina, para em seguida realizar a remoção dos fêmures. Neste procedimento foi verificada a ausência de tecido ovariano e testicular, além da atrofia das vesículas seminais e próstata ventral para confirmação da orquiectomia, e ausência dos ovários e atrofia uterina para confirmação da ovariectomia.

Os fêmures esquerdos depois de removidos e dissecados foram armazenados individualmente em solução fisiológica de cloreto de

sódio 0,9% (Laboratório Tayuyna[®], Nova Odessa - Brasil) a temperatura constante de - 20 °C.

Os fêmures direitos, depois de removidos, dissecados e secos com auxílio de gaze estéril foram armazenados individualmente em tubos criogênicos (Nalgene Labware[®], Rochester - EUA) devidamente identificados e numerados, para serem transportados até o Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica (LEVB), do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) da Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP em São José dos Campos/São Paulo, onde foi realizada a análise por microfluorescência de raios-x.

4.6 Variáveis estudadas

Os parâmetros avaliados podem ser divididos em análises biométricas e nutricionais (evolução ponderal, quociente de eficiência alimentar e morfometria femoral), análise das propriedades biomecânicas (teste de flexão-compressão em 3 pontos e análise intrínseca da cortical), quantificação mineral óssea (microfluorescência de raios-x) e análise bioquímica (cálcio e fosfato inorgânico plasmático), sendo os fêmures separados de acordo com análises destrutivas (fêmur esquerdo) e não destrutivas (fêmur direito) conforme Figura 6.

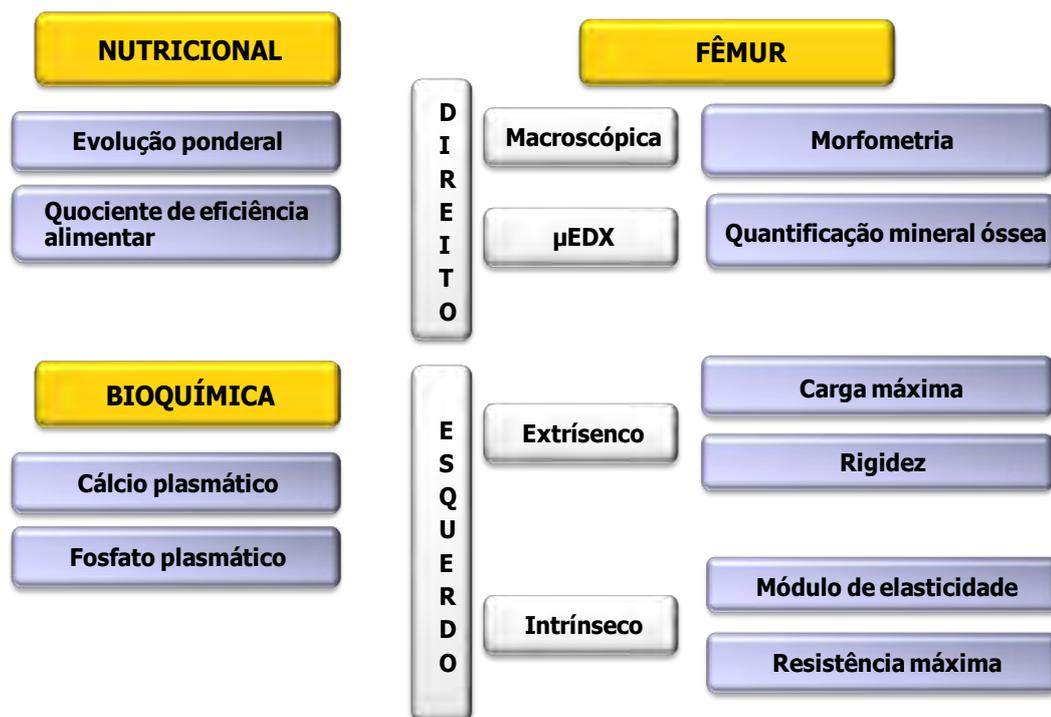


Figura 6 – Distribuição dos fêmures por análise.

4.6.1 Análises biométricas e nutricionais

4.6.1.1 Evolução ponderal

A massa corpórea dos animais foi aferida no dia da cirurgia (17^a semana), no início da dieta (22^a semana) e no final do experimento (30^a semana).

A partir desses dados foi calculada a evolução ponderal por animal. Este cálculo foi obtido subtraindo-se do peso final (g) de cada animal o peso inicial (g) e dividindo este valor pelo peso inicial (g) multiplicado por 100, para obter o valor em percentual (Rocha, 2005).

4.6.1.2 Quociente de Eficiência Alimentar (QEA)

Diariamente foram registrados os valores médios das dietas sólidas e líquidas consumida por cada animal. A partir desses dados foi calculada a média de consumo para todos os grupos experimentais, considerando ração ingerida (g e kcal), solução líquida (mL e kcal), dieta total (kcal) e percentual correspondente às dietas líquida e sólida.

Com a finalidade de analisar a capacidade do animal converter em peso corporal a energia alimentar consumida, foi realizado o cálculo do quociente de eficiência alimentar dividindo-se o ganho médio de massa corporal (g) de cada animal, pelo consumo total da dieta (kcal), multiplicado por 100 (Botelho et al., 2005; Henriques et al., 2008).

Neste estudo, os cálculos nutricionais foram baseados nos valores de energia metabolizável da ração oferecida aos animais controle. No grupo controle a ração foi responsável por 100% do conteúdo calórico, enquanto nos grupos Etanol ela foi responsável por apenas (64,20%) em média, sendo o restante das calorias provenientes da solução hidroalcoólica.

Para os animais do grupo isocalórico, os mesmos 64,20% das calorias da dieta foram fornecidos através da ração, e o restante pela solução de sacarose.

4.6.1.3 Morfometria do fêmur

No fêmur direito com auxílio de paquímetro digital com precisão de 0,05 milímetros (modelo 727 Starret[®], Athol - EUA), foi realizada a mensuração do comprimento e diâmetro.

Para o comprimento do fêmur foi tomando como referência a região distal dos côndilos femorais (região articular com a tibia) e saliência óssea mais proximal do trocanter maior. O diâmetro femoral foi mensurado através da espessura médio-lateral da região mediana da diáfise (Figura 7).



Figura 7 - Medição do fêmur com paquímetro digital.

4.6.2 Análises das propriedades biomecânicas

Para avaliar a biomecânica femoral os fêmures esquerdos foram submetidos a testes de propriedades biomecânicas pelo ensaio de resistência à flexão-compressão em 3 pontos e em seguida pela análise da cortical óssea.

Através do ensaio de flexão-compressão em 3 pontos foram analisadas as propriedades extrínsecas que se referem ao osso intacto, refletindo em seus valores os efeitos combinados da morfometria, mineralização e características teciduais. Para avaliar a propriedade intrínseca através de medições de um corpo de prova gerado após o teste

anterior, que reflete o comportamento da cortical óssea no ponto de ruptura da carga máxima (Ramadoss et al., 2006).

4.6.2.1 Propriedades biomecânicas extrínsecas

As propriedades biomecânicas extrínsecas dos fêmures foram determinadas por meio do teste de resistência à flexão-compressão em três pontos. O ensaio foi conduzido em uma Máquina Universal de Ensaio Emic[®] (modelo DL 2000 Equipamentos e Sistemas de Ensaio Ltda, São José dos Pinhais - Brasil) (Figura 8A).

Para permanecer em equilíbrio térmico com o meio ambiente e evitar microfraturas, os fêmures foram descongelados gradualmente, sob refrigeração, 24 horas antes dos ensaios, e mantidos em solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9% até o momento anterior ao teste. Todo o procedimento foi realizado em temperatura ambiente e as amostras levemente hidratadas.

Cada espécime foi centralizada ao longo de seu comprimento sobre um suporte contendo dois apoios de 3 mm, distantes 15 mm um do outro, com sua face anterior voltada para baixo e apoiados na região metafisiária, conforme demonstrado na figura 8B.

Uma pré-carga foi aplicada para acomodação do sistema máquina-acessório-fêmur. Para tanto, foi utilizada a célula de carga de 100 kgf de capacidade máxima ajustada para escala de 50 kgf ou 490 N.

A carga constante de até 50 kgf foi aplicada perpendicularmente ao eixo longitudinal do osso, no sentido pósterio-anterior, no meio da distância entre os dois apoios, numa velocidade constante de 5 mm/min até a falha do espécime (Senra, 2009).

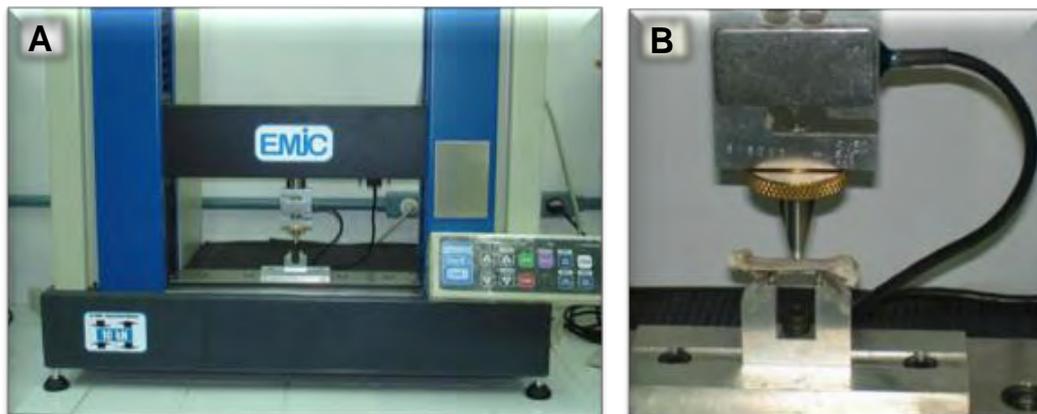


Figura 8 – A: máquina universal de ensaio. B: teste de flexão-compressão em 3 pontos no fêmur.

Com um computador acoplado à máquina universal de ensaio associado ao programa de computador de automação de ensaios Tesc[®] (versão 1.1 Standard EMIC, São José dos Pinhais - Brasil) foi possível controlar os parâmetros dos ensaios e calcular, automaticamente, os valores correspondentes à carga máxima (N) e à rigidez ($\times 10^3$ N/m) para cada animal.

A obtenção dos pontos de análise, que em seguida é convertido nos valores de carga e rigidez, foi realizada em intervalos não padronizados de tempo definidos pelo programa, que emite um arquivo para cada ensaio com os valores de tempo em segundos (s), deslocamento em milímetros (mm) e carga em Newton (N).

Em seguida, os dados foram transcritos para o programa Office Excel[®] (versão 14.0 Microsoft Corporation, Redmond - EUA), onde os valores foram compilados e as propriedades biomecânicas extrínsecas dos fêmures foram calculadas (Senra, 2009).

4.6.2.2 Propriedades biomecânicas intrínsecas

Após o ensaio de flexão-compressão, cada segmento distal ósseo foi separado para análise intrínseca do osso cortical. Com auxílio de um micromotor com peça reta KaVo® (KaVo do Brasil, Joinville - Brasil) sob alta rotação e irrigação com solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, foram realizadas secções transversais de aproximadamente 1 milímetro de espessura na região adjacente ao local da ruptura dos fêmures após o teste de flexão-compressão em 3 pontos (Ramadoss et al., 2006).

As amostras foram então coradas por 3 minutos com azul de metileno a 1% (Synth®, Diadema - Brasil) para otimizar a visualização, e dispostas sobre uma lâmina de vidro e analisadas em um estereomicroscópio Stemi® (modelo 2000-C Carl Zeiss, Bernried - Alemanha) com aumento de 20 vezes.

A imagem de cada espécime foi obtida por câmera digital Sony® (modelo Cybershot DSC-W5, Tokyo - Japão), acoplada ao estereomicroscópio auxiliado por régua milimetrada.

Em seguida, as imagens foram processadas pelo programa UTHSCSA Image Tool® (versão 3.0 University of Texas Health Science Center, San Antonio - EUA) para determinar o “*cross sectional moment of inertia*” (CSMI) pela fórmula de Jarvinen et al. (1998) (1). Onde: “T” é a espessura externa e “t” a espessura interna, no sentido antero-posterior. “W” é a largura externa e “w” é a largura interna, no sentido médio-lateral:

$$\text{CSMI} = \pi / 64 \times [(T^3 W) - (t^3 w)] \quad (1)$$

A partir deste resultado, utilizando a metodologia descrita por Compagnucci et al. (2007) foram determinadas as propriedades

intrínsecas da cortical óssea. O módulo de elasticidade (MPa) (2), onde “K” é a rigidez, “L” é o comprimento do osso, e “CSMI” é o momento de inércia. E também a resistência máxima (MPa) (3), onde “d” é o diâmetro externo da cortical. Calculados pelas fórmulas:

$$\text{Módulo de Elasticidade} = (K \times L \times 3)/(48 \times \text{CSMI}) \quad (2)$$

$$\text{Resistência Máxima} = (\text{carga máxima} \times L \times d)/(8 \times \text{CSMI}) \quad (3)$$

Os dados foram então transcritos para o programa Office Excel[®], onde os valores foram compilados e realizados os cálculos das propriedades biomecânicas intrínsecas do fêmur.

4.6.3 Quantificação mineral óssea

Os fêmures direito dos ratos foram avaliados através de espectrometria para determinar a concentração em peso proporcional dos elementos cálcio e fósforo e também a relação molar entre eles (Ca/P).

As análises foram efetuadas em um equipamento de microfluorescência de raios-x (modelo 1300 Shimadzu[®], Kyoto - Japão) (Figura 9A), equipado com tubo de raios-x de ródio (Rh). A contagem da radiação foi feita por um detector semicondutor de silício-lítio (Si(Li)) refrigerado por nitrogênio líquido, conectado a um computador para realização do processamento de dados.

A varredura foi realizada longitudinalmente em toda a extensão plana do osso, excluindo as epífises que, para facilitar o posicionamento da amostra, foram seccionados em uma cortadora de disco diamantado Isomet[®] (modelo 1000 Buehler International, Lake Bluff

– EUA) com 0,3 mm de espessura sob alta rotação e irrigação com solução fisiologia a 0,9%.

No momento do teste, os fêmures foram fixados com auxílio de plasticina (Acrilex[®], São Bernardo do Campo - Brasil) em uma placa de vidro. A placa de vidro contendo os ossos foi posicionada convenientemente no porta-amostra do equipamento para uma boa visualização da superfície a ser analisada.

A calibração do equipamento foi realizada utilizando-se como referência a hidroxiapatita estequiométrica sintética com grau de pureza mínima de 99.999% $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Sigma-Aldrich[®], St. Louis - EUA). Após calibração da energia por padrões internos do equipamento, as medidas foram coletadas utilizando-se os parâmetros fundamentais de emissão de raios-x característicos dos principais elementos químicos presentes na hidroxiapatita do fêmur, que são o cálcio (Ca) e o fósforo (P). O elemento oxigênio (O) foi utilizado como balanço químico de massa total e o elemento hidrogênio (H) não foi considerado, uma vez que sua massa é equivalente a 0,1% do peso total da hidroxiapatita (Carvalho et al., 2009; Senra, 2009).

A tensão e a corrente do tubo foram de 15 kv (auto), com ajuste automático da corrente e feixe com diâmetro de 50 micrômetros (μm). A varredura foi realizada em linha horizontal a cada 50 μm tomando como partida a porção medial do fêmur, totalizando 200 pontos por amostra, com tempo de leitura de 10 segundos por ponto (tempo real), somando um total de 260 minutos para cada leitura da amostra (Figura 9B).

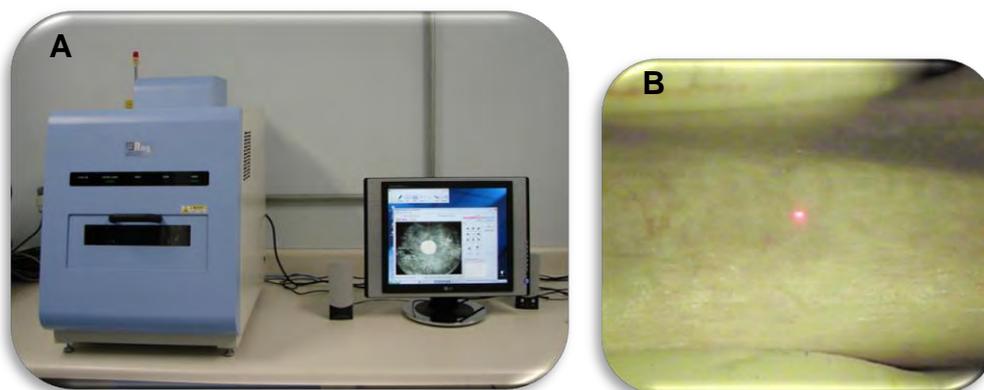


Figura 9 – A: espectrômetro de microfluorescência de raios-x. B: *laserpoint* indicando o ponto inicial da leitura.

Após o término da leitura em varredura, foi gerado um gráfico com o posicionamento e as médias da concentração de Ca e P no fêmur. A proporção entre os elementos químicos da amostra foi calculada pela razão do peso relativo determinado nas leituras do equipamento, que converte a intensidade relativa da energia de transição do raios-x característico do elementos para os respectivos teores em porcentagem de peso (Figura 10).

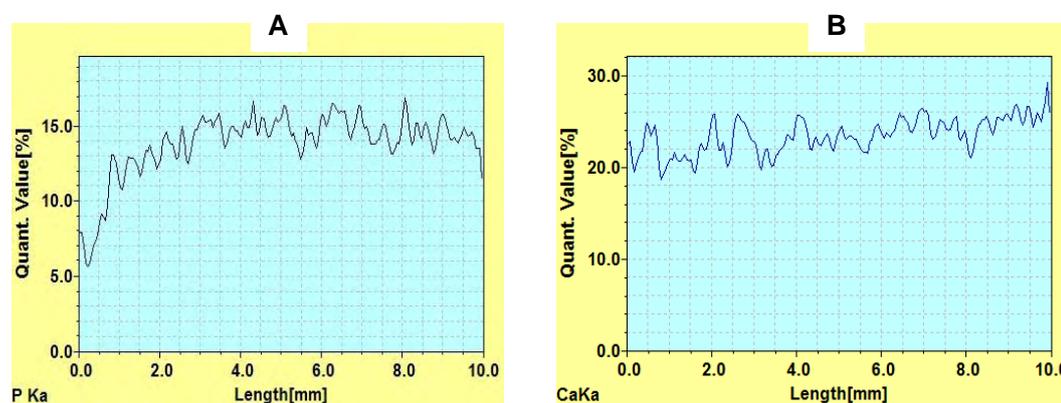


Figura 10 - Exemplo da obtenção da concentração em forma de gráfico dos minerais fósforo (A) e cálcio (B) nos fêmures de ratos.

Após a coleta dos dados, os espectros obtidos foram tratados por um processo de filtragem (*smoothing*) com cinco pontos no

programa de computador PCMEDX[®] (versão 1.04 Shimadzu, Kyoto - Japão) e em seguida foram tabulados em uma planilha do programa Office Excel[®] para realização dos cálculos estatísticos.

4.6.4 Parâmetros bioquímicos

As concentrações plasmáticas de cálcio e fosfato inorgânico foram quantificadas por técnicas analíticas em espectrofotômetro automatizado Cobas Integra[®] (modelo 400 Plus Roche Diagnostic, Basel - Suíça) e com reagentes padronizados para este equipamento. Todas as amostras foram coletadas no mesmo horário, pela manhã, para que os resultados não sofressem interferência do ciclo circadiano ou da ingestão alimentar.

4.6.4.1 Análise da concentração de cálcio (Ca^{+2})

A concentração de cálcio nas amostras de plasma foi determinada pelo método colorimétrico utilizando reagentes para sangue da Cobas Integra Calcium[®] (Roche Diagnostic, Basel - Suíça) onde o cálcio reage com o substrato formando um complexo colorido cuja intensidade de cor é diretamente proporcional à concentração de cálcio.

A absorvância da amostra foi medida em 552/629 nanômetros. Para o cálculo das concentrações de cálcio foram utilizados 0,04 mL de plasma de cada animal seguindo a metodologia estabelecida pelo fabricante.

4.6.4.2 Análise da atividade enzimática de fosfato inorgânico sérico (P)

A atividade enzimática do fosfato inorgânico sérico no plasma dos animais foi determinada pelo método colorimétrico de identificação da absorvância utilizando reagentes para sangue da Cobas Integra Phosphate Inorganic[®] (Roche Diagnostic, Basel - Suíça).

A intensidade da cor formada em cada amostra é diretamente proporcional à atividade enzimática, e foi registrada em espectro de um comprimento de onda de 340/659 nanômetros. Para tanto, foram utilizados 0,05 mL de plasma de cada animal seguindo método padronizado pelo fabricante.

4.7 Análises Estatísticas

Após a coleta dos dados, os valores obtidos foram comparados entre si através de análise estatística paramétrica e não-paramétrica de acordo com tipo de cirurgia e tipo de dieta e, em seguida, comparados conforme o gênero. Em todos os casos, foi considerado significativo valor $p < 0,05$ ($p = 5\%$).

Análises da condição nutricional e da eficiência alimentar foram avaliadas somente de forma descritiva. Para verificar a homogeneidade entre os grupos, utilizou-se a análise de variância (*one-way ANOVA*), seguida do pós-teste de comparação múltipla de Tukey para os dados obtidos na análise de evolução ponderal, comprimento e diâmetro femoral, carga máxima, rigidez, resistência máxima, módulo de elasticidade, cálcio e fosfato inorgânico plasmático.

Na análise estatística dos dados obtidos da proporção Ca/P, fósforo e cálcio ósseo, foi utilizado o teste não-paramétrico de Dunn-Bonferroni, seguido do pós-teste de Kruskal-Wallis.

Para as análises estatísticas foram utilizados os programas Minitab[®] (versão 15.1.1.0 Minitab Inc., State College - EUA) e GraphPad[®] (versão 3.12009 GraphPad Software, San Diego - EUA) e os gráficos confeccionados através do programa Statistix[®] for Windows (versão 8.02003 Analytical Software, Tallahassee – EUA).

5 RESULTADOS

Durante a execução do experimento, dois animais do grupo G6 morreram espontaneamente. Os demais apresentaram estado de saúde geral satisfatório.

Não ocorreram alterações quanto ao aspecto de urina, fezes e pelos ao longo do experimento. Nos animais submetidos à dieta hidroalcoólica foi observado um estado letárgico por consequência da alta concentração alcoólica.

Com a finalidade de confirmar a instalação da deficiência hormonal e consequente indução da perda óssea, foi observado visualmente a atrofia do útero e das vesículas seminais nos grupos ovariectomizados e orquiectomizados.

A análise da diferença estatística entre os gêneros está descrita nos resultados, mas não está representada nos gráficos.

5.1 Análises biométricas e nutricionais

5.1.1 Evolução ponderal

A estatística descritiva dos dados de evolução ponderal dos animais está representada para todos os grupos experimentais na forma gráfica na figura 11.

Com relação às ratas fêmeas houve ganho de massa corporal (g) progressiva em todas as variáveis experimentais. Os grupos G1, G2, G4 e G5 diferiram estatisticamente do grupo G3.

Conforme observado na figura 11, a evolução ponderal dos animais machos durante todo o período diferiu entre os grupos. Valores negativos de evolução ponderal foram observados nos grupos G7, G8 e G11. Os outros grupos experimentais apresentaram valores médios de massa corporal final maiores que os valores iniciais, representando ganho de peso ao longo do experimento.

A análise estatística revelou diferença significativa quanto às variáveis dieta e deficiência hormonal, sendo que o grupo G12 demonstrou diferença em relação aos grupos G7, G8 e G11. Também houve diferença entre o grupo G9 comparado a G7, G8 e G11.

Os gêneros, quando comparados, revelaram diferença significativa entre a maioria dos grupos experimentais, sendo diferentes os grupos G7, G8 e G11 de todos os grupos de fêmeas. Também foi observada diferença entre os grupos G10 e os grupos G6 e G3. Do mesmo modo, houve diferença entre o grupo G3 e G12.

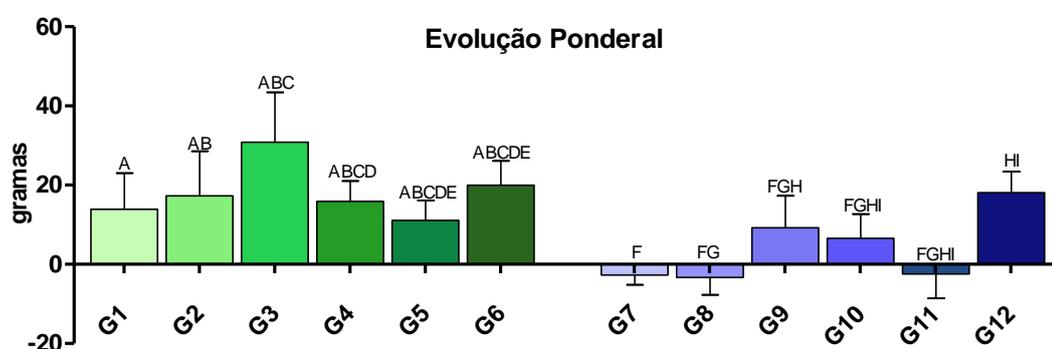


Figura 11 – Média e desvio-padrão dos valores de evolução ponderal (grama) obtidos de todos os grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) (^{ABCDEFGHI} = $p < 0,05$).

5.1.2 Quociente de Eficiência Alimentar (QEA)

No cálculo da eficiência alimentar, os valores médios do consumo de ração, etanol e sacarose foram convertidos em kilocaloria (kcal) e estão expressos por animal. Os dados de consumo calórico, hídrico e o quociente de eficiência alimentar de todos os grupos experimentais estão descritos na tabela 3.

A média de consumo calórico (kcal) das ratas fêmeas, representada na tabela 3, revelou que os grupos submetidos à dieta alcoólica (G1 e G4), apesar do alto consumo energético, apresentaram baixa eficiência alimentar. Nestes grupos de animais, também foram observados os menores valores de consumo hídrico.

A porcentagem de eficiência alimentar mais elevada foi observada nos animais controle ovariectomizado (G3) e Sham (G6), coincidindo apenas no grupo G3 com o maior consumo calórico. O menor QEA foi do grupo G5, também coincidindo com o menor consumo calórico (Tabela 3).

Quanto ao quociente de eficiência alimentar dos ratos machos, foi observado que, ao longo das 13 semanas de experimento, os o grupo isocalórico orquiectomizados (G8), seguido do grupo etanol orquiectomizados (G7) foram aqueles que apresentaram os menores índices. A maior QEA e consumo calórico foram obtidos pelo grupo de animais controle (G12).

A eficácia alimentar coincidiu com o consumo calórico em todos os grupos experimentais de machos, sendo o maior consumo calórico proporcional com a maior QEA. Semelhante às fêmeas, a menor hidratação ocorreu nos animais submetidos ao consumo de etanol (G7 e G10).

Tabela 3 – Média diária por animal do quociente de eficiência alimentar (%), ingestão calórica (kcal) e hidratação (mL).

	Caloria etanol (kcal)	Caloria total (kcal)	Água (mL)	QEA(%)
G1	18,40	64,31	12,99	21,61
G2	-	58,31	27,13	29,65
G3	-	66,19	25,0	46,61
G4	19,41	65,70	13,71	24,25
G5	-	57,76	28,24	19,22
G6	-	60,37	32,0	33,03
G7	20,71	70,11	16,57	-3,85
G8	-	69,32	36,19	-4,73
G9	-	90,34	39,70	10,23
G10	19,63	80,93	15,70	8,11
G11	-	72,17	33,90	-3,33
G12	-	105,83	43,04	17,08

5.1.3 Morfometria femoral

A estatística descritiva dos dados de morfometria do fêmur direito está representada para todos os grupos experimentais na forma gráfica na figura 12.

Quanto ao comprimento femoral (mm) de ratas fêmeas, não foi verificada interação significativa entre os fatores dieta e deficiência hormonal (Figura 12).

Na análise comparativa entre o comprimento do fêmur de ratos machos, verificou-se que os animais do grupo controle (G12) obtiveram os maiores valores de comprimento femoral, sendo diferente estatisticamente dos grupos G7, G8 e G9. Também foi observada

diferença entre G11 e os grupos G7 e G8 e entre o grupo G8 quando comparado ao G9 e G10 (Figura 12).

De acordo com o teste Tukey, os valores de comprimento femoral sofreram influência da orquiectomia, uma vez que os grupos Sham (G10, G11 e G12) apresentaram as maiores medidas de comprimento (Figura 12).

A comparação entre gêneros revelou que o menor comprimento femoral foi obtido pelas ratas fêmeas, diferenciando-se estatisticamente todos os grupos experimentais de machos, independente das variáveis estudadas.

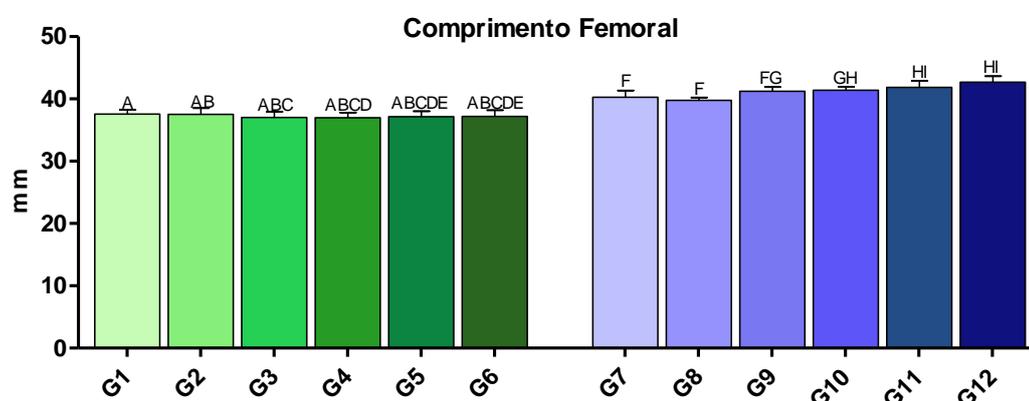


Figura 12 - Média e desvio-padrão dos valores de comprimento femoral (mm) obtidos em todos os grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) (^{ABCDEFGHI} = $p < 0,05$).

Observando-se os dados do diâmetro femoral (mm) das fêmeas representados na figura 13, foi possível verificar diferença entre o grupo G1 comparado a G2 e G5 e também do grupo G3 comparado a G2 e G5. Além disso, o grupo G2 também diferiu dos grupos G4 e G6.

Na comparação entre o diâmetro femoral dos ratos machos, não foi verificada diferença na interação entre as variáveis dieta e deficiência hormonal, conforme representação na figura 13.

Considerando os gêneros, a análise estatística revelou diferença dos grupos de fêmeas G2 e G5 quando comparados a todos os

grupos de ratos machos. Do mesmo modo, foi verificada diferença entre os valores obtidos no grupo G4 ao serem comparados ao grupo G10. Os menores valores absolutos de diâmetro femoral foram obtidos pelos grupos submetidos à dieta isocalórica, tanto nos machos quanto nas fêmeas (Figura 13).

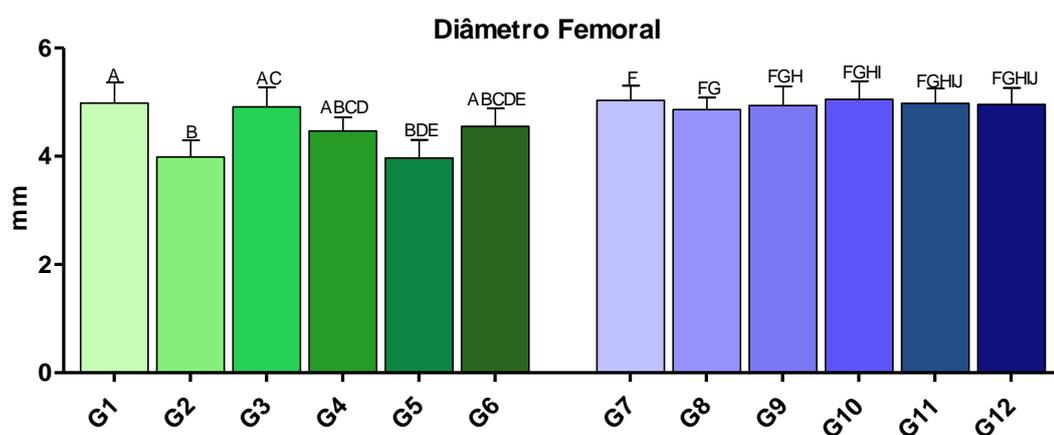


Figura 13 - Média e desvio-padrão dos valores de diâmetro femoral (mm) obtidos em todos os grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) ($^{ABCDEFGHIJ} = p < 0,05$).

5.2 Análises das propriedades biomecânicas

5.2.1 Propriedades biomecânicas extrínsecas

Para o teste de flexão-compressão em três pontos do fêmur esquerdo, uma curva carga-deslocamento típica foi obtida para cada espécime e convertido para valores em forma de gráfico de coluna.

Os dados estatísticos referentes às propriedades biomecânicas extrínsecas de carga máxima e rigidez para todos os

grupos experimentais estão representados nas figuras 14 e 15, respectivamente.

De acordo com a análise de variância ANOVA, os valores médios de carga máxima (N) obtidos dos grupos de ratas fêmeas não revelaram diferença estatística entre si (Figura 14).

No gráfico representativo de carga máxima da figura 14, os valores obtidos pelos ratos machos revelaram diferença significativa entre os grupos G10 e G12 quando comparados aos grupos orquiectomizados (G7, G8 e G9). Também foi observada diferença entre o grupo G7 e G11.

Considerando o gênero, conforme representação na figura 14, os grupos de ratos machos não orquiectomizados (G10, G11 e G12) diferiram de todos os grupos de ratas fêmeas. Da mesma maneira, houve diferença significativa entre a carga máxima do grupo de machos G8 ao ser comparado aos grupos de fêmeas G3 e G4.

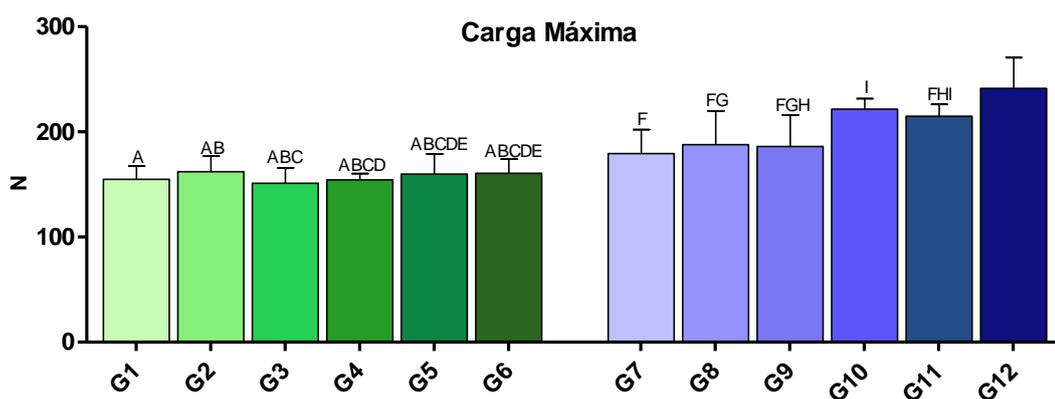


Figura 14 - Média e desvio-padrão dos valores de carga máxima (N) obtidos em todos os fêmures dos grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) ($^{ABCDEFGHI} = p < 0,05$).

A análise dos valores de rigidez obtidos para os fêmures das ratas fêmeas ($\times 10^3$ N/m) revelou valores elevados de desvio-padrão intragrupo, aumentando o valor do coeficiente de variação em cada condição estudada, destacando-se os grupos de dieta isocalórica G2

(coeficiente 0,25) e G4 (coeficiente 0,35). Essa grande variação de desvio-padrão não permitiu que os grupos experimentais tivessem valores estatisticamente significativos entre si, mesmo quando as médias encontradas apresentaram variações expressivas (Figura 15).

Os valores de rigidez do fêmur de ratos machos representados na figura 15, também revelaram elevado desvio-padrão intragrupo, com coeficiente de variação aumentado nos grupos orquiectomizados G7 (coeficiente 0,32), G8 (coeficiente 0,43) e G9 (coeficiente 0,52).

Para os animais machos submetidos à falsa-orquiectomia (Sham), somente o grupo G12 apresentou elevado coeficiente de variação (0,32), revelando também, que a maior rigidez entre todos os grupos experimentais foi obtida nos animais não submetidos à alteração da dieta ou deficiência hormonal.

Com exceção dos grupos G7 e G12, que diferiram de forma significativa entre si, estas variações de desvio-padrão também não permitiram que os grupos experimentais tivessem valores estatisticamente significativos nos ratos machos.

Na comparação entre a rigidez femoral de machos e fêmeas, a análise de Tukey revelou que o grupo G12 diferiu de todos os grupos experimentais de fêmeas.

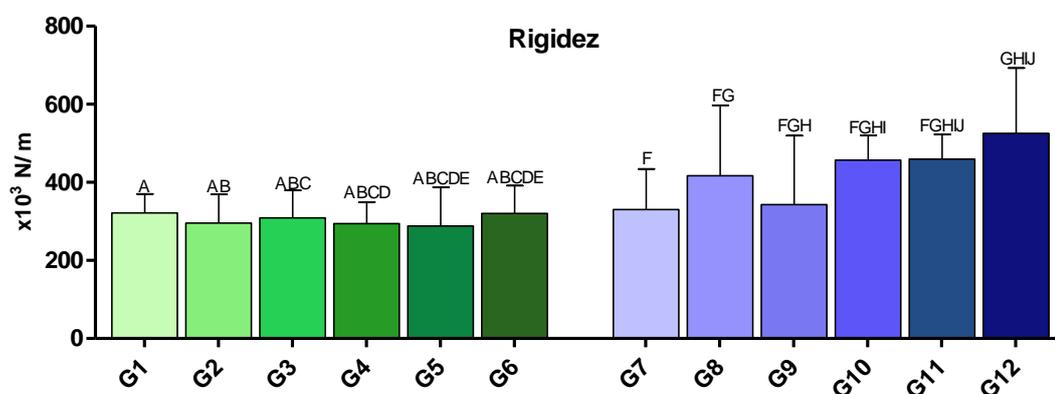


Figura 15 - Média e desvio-padrão dos valores de rigidez ($\times 10^3$ N/m) obtidos em todos os fêmures dos grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) ($^{ABCDEFGHIJ} = p < 0,05$).

5.2.2 Propriedades biomecânicas intrínsecas

Os dados estatísticos referentes às propriedades biomecânicas intrínsecas do fêmur esquerdo (módulo de elasticidade e resistência máxima), para todos os grupos experimentais estão representados nas figuras 16 e 17.

De acordo com a análise de variância ANOVA, não houve diferença estatística nos valores médios do módulo de elasticidade (mPa) na comparação entre os grupos experimentais de fêmeas ou de machos (Figura 16).

Na comparação entre gêneros para os valores de módulo de elasticidade, a análise de Tukey revelou que somente o grupo de fêmeas G5 diferiu do grupo de machos G7.

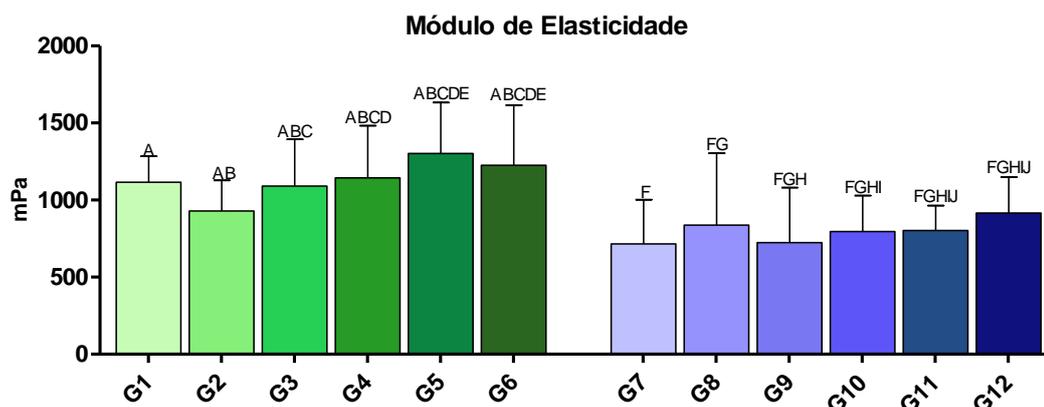


Figura 16 - Média e desvio-padrão dos valores do módulo de elasticidade (mPa) obtidos em todos os fêmures dos grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) ($^{ABCDEFGHIJ} = p < 0,05$).

Conforme representação na figura 17, foi possível observar que os valores de resistência máxima femoral (mPa) não diferiram estatisticamente em nenhuma das comparações entre os grupos experimentais de machos ou de fêmeas.

Na comparação entre gêneros, somente o grupo de ratas fêmeas G5 diferiu dos grupos de machos G9, G10, G11 e G12 (Figura 17).

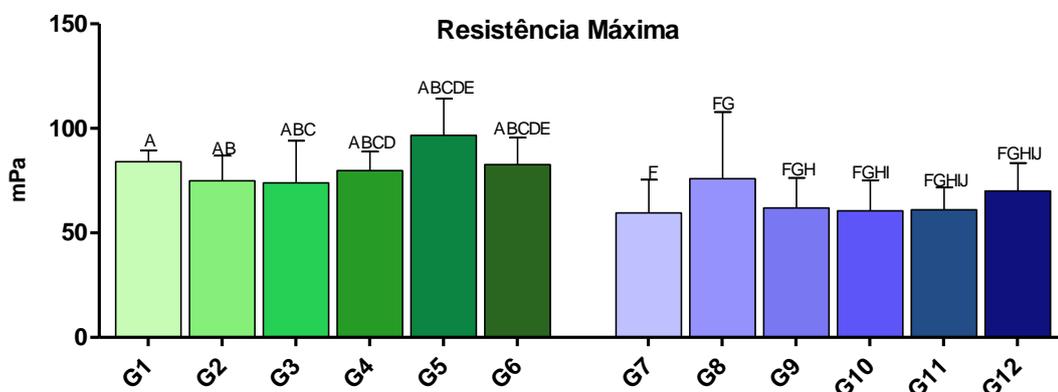


Figura 17 - Média e desvio-padrão dos valores da resistência máxima (mPa) obtidos em todos os fêmures dos grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) (^{ABCDEFGHIJ} = $p < 0,05$).

5.3 Quantificação mineral óssea

Os valores da média e desvio-padrão referentes à porcentagem de cálcio, porcentagem de fósforo e a porcentagem molar da relação Ca/P, obtidos através da análise do fêmur direito pela técnica de microfluorescência de raios-x, encontram-se representados na forma gráfica nas figuras 18, 19 e 20, respectivamente.

Na análise do cálcio ósseo (%) dos grupos de ratas fêmeas, foi possível observar diferença fortemente significativa entre a maioria dos grupos experimentais. Não foi verificada diferença apenas na comparação entre os grupos G2 e G6 e entre os grupos G4 e G5 (Figura 18).

A comparação entre a porcentagem de cálcio ósseo obtido do fêmur de ratos machos permitiu observar a presença de forte diferença estatística entre os grupos experimentais, com exceção do grupo G9 e G12 e ainda do grupo G10 comparado aos grupos G7 e G8, que não diferiram entre si. Os menores valores absolutos de cálcio ósseo nos machos foram obtidos pelos grupos Isocalóricos (Figura 18).

Diferença significativa também foi encontrada na maioria das comparações entre os grupos experimentais de machos e fêmeas. No entanto, o grupo G4 não diferiu dos grupos G7 e G10, bem como o grupo G5 não diferiu dos grupos G7 e também o grupo G6 não diferiu dos grupos G9 e G12. Os maiores valores absolutos de cálcio ósseo foram obtidos pelos grupos controle, tanto nos machos quanto nas fêmeas.

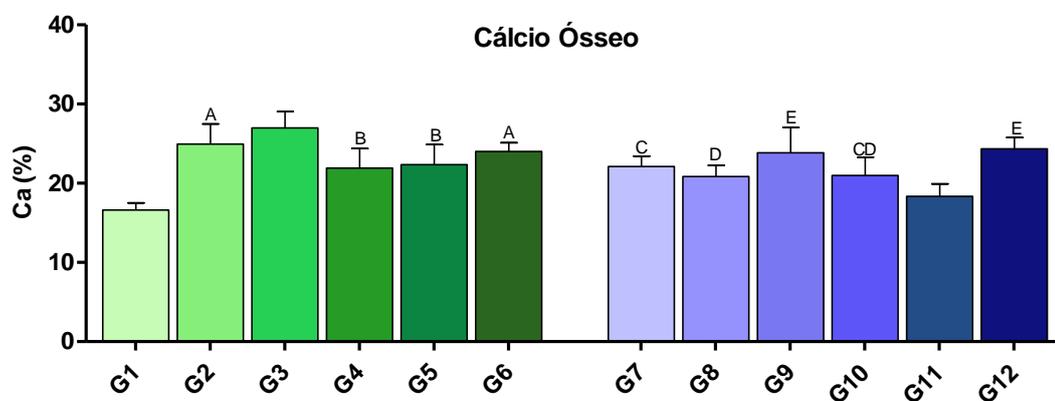


Figura 18 - Média e desvio-padrão dos valores de cálcio (%) obtidos do fêmur de todos os grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) (^{ABCDE} = $p < 0,05$).

Através da análise estatística de Dunn-Bonferroni pode-se observar que os valores de fósforo ósseo (%) obtidos do fêmur das ratas fêmeas diferiram em quase todos os grupos experimentais, exceto no grupo G1 comparado a G5, no grupo G2 comparado a G3 e G4, e ainda, no grupo G3 comparado ao grupo G4 (Figura 19).

Observando os valores de fósforo ósseo de ratos machos representados na figura 19, foi possível verificar forte diferença

significativa entre a maioria dos grupos experimentais, exceto o grupo G10 comparado a G12 e o grupo G9 comparado a G10 e G12.

De acordo com as análises estatísticas, ocorreu diferença significativa na maioria das comparações dos valores de fósforo ósseo de ratos machos e fêmeas. Somente não foram verificadas diferenças entre o grupo G7 comparo a G2, G3 e G4 e também entre G6 comparado a G8, G9 e G10.

Na comparação do fósforo ósseo também houve outra diferença nos resultados entre gêneros, as fêmeas submetidas a dieta alcoólica e deficiência hormonal (G1) revelaram pequena redução de fósforo em relação a maioria dos outros grupos de fêmeas (com exceção de G6), por outro lado, os ratos machos submetidos ao mesmo protocolo experimental (G7), demonstraram grande elevação nos valores de fósforo ósseo.

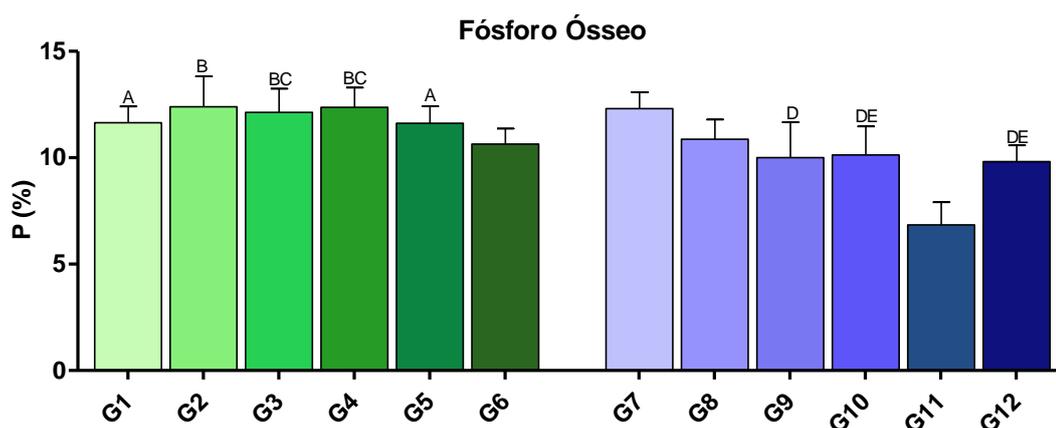


Figura 19 - Média e desvio-padrão dos valores de fósforo (%) obtidos do fêmur de todos os grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) (^{ABCDE} = $p < 0,05$).

Pela análise da representação gráfica da proporção de Ca/P (mol) de ratas fêmeas na figura 20, verificou-se forte diferença entre os grupos experimentais, exceto G3 que não diferiu de G6.

Quanto aos machos, a proporção molar de Ca/P também revelou forte diferença estatística entre os grupos, com exceção do grupo G12 que não diferiu dos grupos G9 e G11 (Figura 20).

Na comparação entre gêneros, não houve diferença estatística entre o grupo G2 comparado a G10. Também não foi verificada diferença significativa entre G4 e G7 e entre os grupos G5 e G8.

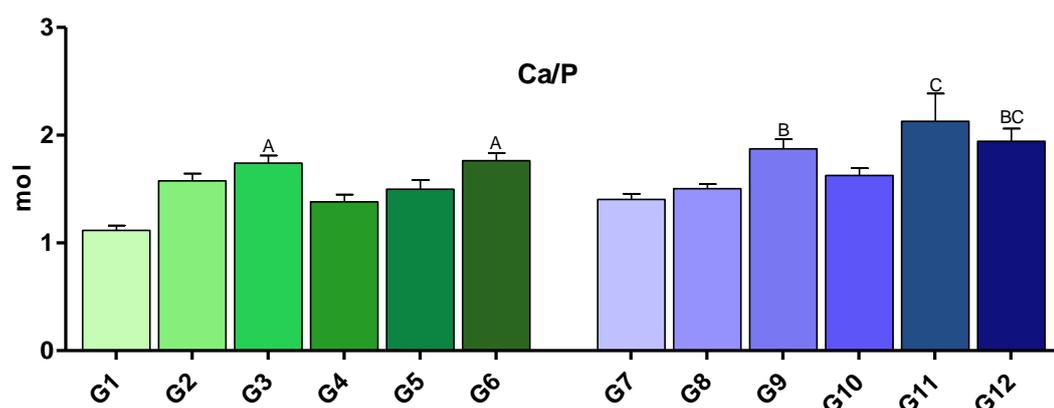


Figura 20 – Média e desvio-padrão dos valores da proporção cálcio/fósforo (mol) obtidos do fêmur de todos os grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) (^{ABC} = $p < 0,05$).

5.4 Parâmetros bioquímicos

A representação gráfica dos valores da média e desvio-padrão referente à análise espectrofotométrica de cálcio (Ca^{+2}) e fosfato inorgânico (HPO_4^{-2}) obtidos do sangue dos animais experimentais encontra-se nas figuras 21 e 22.

A análise estatística através do teste de Tukey cálcio plasmático (mg/dL) de ratas fêmeas revelou que a deficiência hormonal e a dieta alcoólica não influenciaram na concentração de cálcio nas ratas fêmeas (Figura 21).

A comparação das médias da concentração plasmática de cálcio dos ratos machos, mostrou-se estatisticamente diferente nos grupos G11 quando comparado ao grupos G9, G10 e G12. Houve também diferença entre os valores de G8 e de G10. Nos ratos machos, os menores valores absolutos de cálcio foram obtidos nos grupos Isocalóricos (Figura 21).

Na comparação entre gêneros, o cálcio sérico somente diferiu entre os grupos G9 e G10 quando comparados aos grupo G2 e grupo G3. Do mesmo modo, o grupo G1 diferiu do grupo G11.

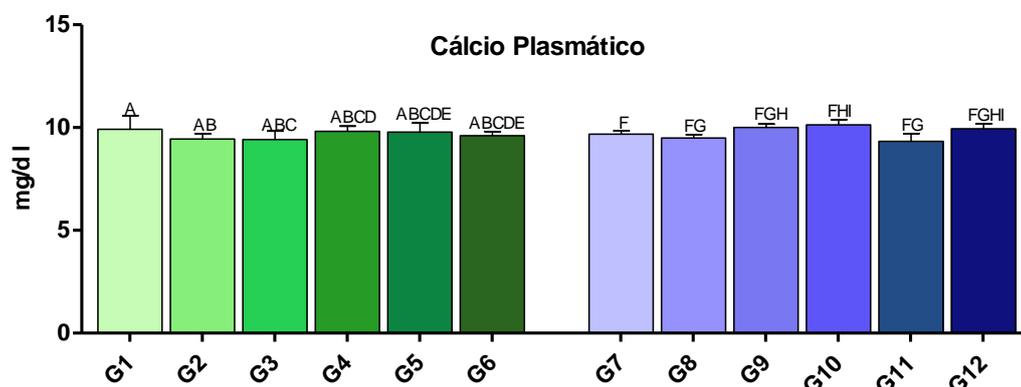


Figura 21 - Média e desvio-padrão dos valores de cálcio plasmático (mg/dL) obtidos do sangue de todos os grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) ($^{ABCDEFGHI} = p < 0,05$).

Quanto aos valores de fosfato inorgânico plasmático (mg/dL) das ratas fêmeas, foi caracterizada diferença significativa somente na comparação entre o grupo G1 e G2. Nas ratas fêmeas, o maior valor absoluto de fosfato foi obtido no grupo submetido à dieta alcoólica e deficiência hormonal (Figura 22).

Conforme representação gráfica da figura 22, a análise estatística do fosfato inorgânico plasmático de ratos machos revelou que o grupo de ratos orquiectomizados (G9) não diferiu somente do grupo submetido a orquiectomia e dieta isocalórica (G8).

Na análise comparativa do fosfato dos grupos de ratos machos e fêmeas, somente os valores médios do grupo G9 diferiram de G1 e G5 (Figura 22).

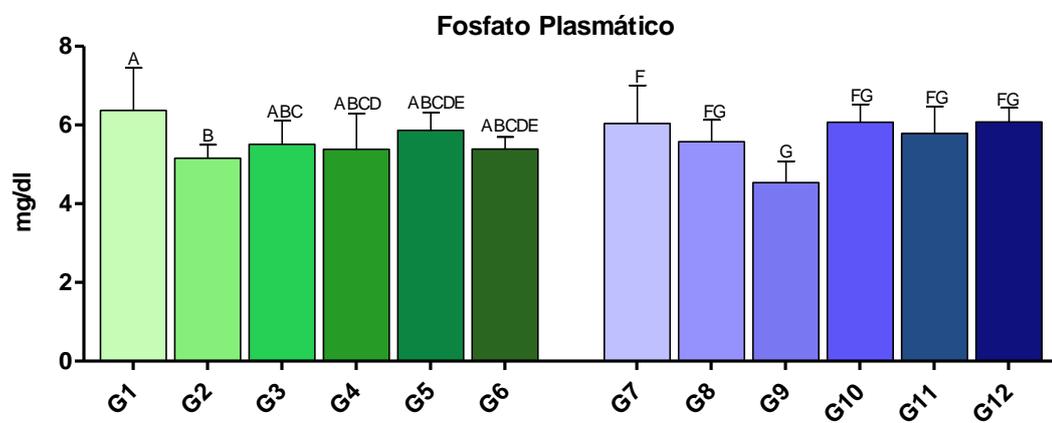


Figura 22 - Média e desvio-padrão dos valores de fosfato plasmático (mg/dL) obtidos do sangue de todos os grupos experimentais (em verde as fêmeas e azul os machos) ($^{ABCDEF G} = p < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram utilizadas metodologias de experimentação animal que simulam o efeito do alcoolismo crônico em indivíduos com osteoporose.

Em ratos, estas técnicas correspondem à indução de perda óssea pelo procedimento de ovariectomia e orquiectomia e a ingestão crônica de etanol em alta concentração. Quando associadas, estas metodologias científicas constituem um modelo pouco estudado, mas de grande conveniência e confiabilidade, principalmente por apresentarem mecanismos de sinergismo biológico semelhante àqueles ocorridos em humanos (Cunningham et al., 2000; Rocha, 2005; Deco, 2009).

A utilização de ratos Wistar adulto-jovens oferecem as vantagens do ciclo estral destes animais ser bem definido (média de 4 a 5 dias), de atingirem rapidamente o amadurecimento sexual (média de 50 a 60 dias de vida), do fácil manuseio e da possibilidade de induzir rapidamente a deficiência hormonal (Turner, 2001). Além disso, estes animais apresentam afinidade para o consumo voluntário de solução alcoólica (Callaci et al., 2004; Chakkalakal et al., 2005; Rocha, 2005).

O procedimento cirúrgico de indução da deficiência hormonal foi precedido, com sucesso, por diversos trabalhos (Turner, 2001; Callaci et al., 2006; Blouin et al., 2007; Senra, 2009), bem como o modelo com dieta alcoólica por consumo voluntário também foi desenvolvido com sucesso em estudos anteriores (Chakkalakal, 2005; Chakkalakal et al., 2005; Rocha, 2005; Alonso, 2009; Deco, 2009).

O período de cinco semanas de castração antes do início da dieta alcoólica foi selecionado a partir das observações de Calero et al., (2000), Rocha (2005), Blouin (2007) e Lazzareti et al. (2008), que declararam em seus estudos que, após 30 dias de ovariectomia ou orquiectomia foi possível instalar o quadro de osteopenia. Além disso, os autores sugerem que este tempo é suficiente para que o animal se recupere completamente do procedimento operatório, sem comprometer os parâmetros de análises ósseas.

A técnica de ovariectomia também é considerada pelo FDA como o melhor modelo de teste pré-clínico de novos fármacos para tratamento de osteoporose, uma vez que esta metodologia promove a rápida indução da osteopenia em animais experimentais (Bonjour et al., 1999).

De acordo com Lévesque e Di Paolo (1990) os níveis plasmáticos de 17 beta-estradiol e de progesterona reduzem drasticamente em dois dias após a ovariectomia de ratas.

Lazzareti et al. (2008), através do monitoramento do ciclo estral de 10 ratas por observação do tipo de célula presente no esfregaço vaginal, verificaram que os animais submetidos à ovariectomia permaneceram na fase diestro, que representa o final do primeiro pico de progesterona e presença de níveis muito reduzidos de estrogênio.

O hipoandrogenismo em homens é considerado fator de risco para osteoporose e redução de massa muscular (Calero et al., 2000; Herbst; Bhasin, 2004; Veloso et al., 2008). Desta forma, a depleção androgênica através da orquiectomia em ratos machos é uma técnica bastante conhecida para indução de osteopenia, sendo capaz de alterar os parâmetros de densitometria óssea um mês após o procedimento cirúrgico (Blouin, 2007).

Considerando que a testosterona é produzida nas células de Leydig testiculares (95%) e em menor proporção pela zona fasciculada e reticulada das supra-renais, pode-se supor que após a orquiectomia, as

glândulas adrenais compensariam a deficiência hormonal. Contudo, trabalhos indicam que os níveis de testosterona mantêm-se muito abaixo do fisiológico após a castração, e que as adrenais não sofrem alterações morfológicas que indiquem aumento compensatório da atividade (Velooso et al., 2008).

A próstata é uma glândula andrógeno-dependente e assim, reflete diretamente os efeitos da deficiência de testosterona provocada pela castração, evidenciando que a orquiectomia é um método adequado para induzir a deficiência hormonal. Por consequência, ocorre também a redução de estrógeno, uma vez que a aromatização hepática da testosterona é a única fonte fisiológica de estrógeno no organismo masculino (García-Flórez et al., 2005).

O consumo excessivo de etanol também é capaz de suprimir o nível de testosterona plasmático em homens e em animais experimentais, além de alterar subprodutos da homeostasia hormonal (Brolukil et al., 2009). Do mesmo modo, Wallock-Montelius et al. (2007), constataram que o consumo crônico de etanol (40%) por micro-porcos da linhagem Yucatan, foi capaz de promover atrofia testicular e reduzir o nível de espermatozóide.

Em estudo menos recente, Martínez et al. (1993), avaliaram o efeito do alcoolismo crônico sobre a próstata de ratos, verificando modificações expressivas na atividade secretora e degeneração celular no epitélio glandular. Estes mesmos achados são observados após a orquiectomia, que promove a depleção de andrógenos e consequentemente atrofia da próstata em mais de 94% quando comparada aos animais controle (Antonioli et al., 2007).

Estes resultados poderiam explicar a ausência de diferença estatística observada na maioria dos parâmetros analisados (evolução ponderal, comprimento e diâmetro femoral, rigidez, módulo de elasticidade, resistência máxima, cálcio ósseo, fosfato e cálcio plasmático), quando são comparados os grupos de ratos submetidos a

dieta alcoólica, com deficiência hormonal (G7) ou Sham (G10), uma vez que o etanol isoladamente, é capaz de alterar os padrões hormonais androgênicos e assim, gerar as mesmas alterações que o hipoandrogenismo causa isoladamente.

Embora o etanol tenha alto valor calórico, seu consumo excessivo promove grande perda na qualidade nutricional pelos hábitos alimentares irregulares além de redução desproporcional do aporte calórico associado às proteínas, lipídeos e vitaminas (Santolaria et al., 2000; Tujague; Keer, 2009).

A quantidade de calorias provenientes do etanol empregada neste estudo foi baseada na dieta Lieber-DeCarli, que utiliza em etanol 36% das calorias totais da dieta. Esta é a metodologia mais utilizada para estudos com animais experimentais (Ponnappa; Rubin, 2000; Piano et al., 2005; Callaci et al., 2009).

Com as devidas proporções, o parâmetro de consumo excessivo de bebida alcoólica para humano pode ser utilizado para o rato, uma vez que ambos dispõem dos mesmos mecanismos microssomais de biotransformação do etanol (Lieber, 2001; Paton, 2005; Gemma et al., 2006). Desta forma, para o rato, uma alta concentração equivale ao consumo 1,56 grama de etanol por animal, que convertido para um homem de aproximadamente 65 quilos corresponderia a 12 latas de cerveja (Broulik et al., 2009).

Nos animais deste experimento, a média de consumo diário das ratas (grupos G1 e G4) foi de 2,66 grama de etanol e dos machos (grupos G7 e G10) foi de 3,22 grama, atingindo, desta maneira, alcoolemia sistêmica elevada. Convertendo os valores obtidos pelo consumo alcoólico dos ratos para um homem (65 kg), corresponderia ao consumo diário de 473 grama de etanol, ou seja, 14 latas de cerveja, ou duas garrafas de cachaça.

Apesar da concentração alcoólica no sangue ser um parâmetro de avaliação de consumo de etanol, não foi realizado teste

bioquímico de alcoolemia. O volume de solução alcoólica ingerido pelos animais era avaliado diariamente, o que permitiu mensurar a ingestão por animal por dia. Sendo o etanol uma substância altamente hidro e lipossolúvel, de rápida distribuição nos fluidos corporais, e que instantaneamente atinge órgãos vascularizados, torna-se desnecessária a análise da alcoolemia para uma dosagem tão elevada como foi utilizada.

Gifford et al. (2008), utilizando marcadores radioativos, verificaram que após 15 minutos da injeção de 1,6 mg etanol em ratos, 0,35 %/g da biodistribuição total situava-se na medula óssea. A maior concentração foi observada nas glândulas lacrimais, seminal e no córtex renal.

Com base em parâmetro volumétrico de ingestão diária de líquidos pelos ratos, foi estabelecida a concentração de 20% de etanol em solução aquosa como dieta líquida (Rocha, 2005; Alonso 2009; Deco, 2009; Souza et al., 2009). Esta concentração já demonstrou fornecer o aporte hídrico necessário para o animal e ser elevada o suficiente para promover alterações fisiológicas sem provocar a morte antes do término do experimento (García-Moreno et al., 2004; Rocha, 2005; Paulson et al., 2010).

Os modelos de dieta alcoólica incluem soluções hidroalcoólicas via ingestão ou via intragástrica ou ainda, injeção intraperitoneal (Sampson, 1997; Ponnappa; Rubin, 2000; Callaci et al., 2004; Sumida et al., 2007). Dentre estes, o método via ingestão é o mais utilizado e, além disso, considerado menos agressivo para o trato gastrointestinal do que a via intragástrica, que utiliza de uma só vez, alta concentração alcoólica (Zakhari, 2006; Otero; Cortés, 2008).

Durante todo o experimento também houve controle nutricional dos animais, bem como avaliação da massa corpórea a fim de estabelecer uma comparação da eficácia alimentar e do impacto na qualidade óssea. Para garantir que os resultados do experimento fossem derivados da ação do etanol e não da desnutrição, foi estabelecido o

grupo pareado (isocalórico) com as mesmas calorias ingeridas pelo grupo que consumiu etanol.

Os dados obtidos neste experimento revelaram diferença entre os grupos submetidos à dieta alcoólica comparado aos de dieta isocalórica em vários parâmetros analíticos (evolução ponderal, diâmetro femoral, proporção molar Ca/P, cálcio e fósforo ósseo e plasmático), demonstrando que o consumo de álcool etílico é pior do que a baixa ingestão nutricional isoladamente, além disso, foi demonstrado que as diferenças ocorrem principalmente no gênero masculino e nos animais sem deficiência hormonal.

Com relação aos ratos machos, é possível que o aumento do nível de catabolismo desencadeado pela desnutrição tenha interferido de forma negativa na evolução ponderal, principalmente nos animais orquiectomizados submetidos à dieta alcoólica. Este fato pode ser explicado pela síndrome da má absorção provocada pelo consumo crônico de etanol, que alteram o epitélio intestinal, ou ainda, uma ação direta da deficiência hormonal sobre a mucosa intestinal, prejudicando o processo de absorção de nutrientes como aminoácidos e a síntese de proteínas (Draper et al., 1983; Lieber, 2000; 2003).

De acordo com Wallen et al. (2002) e Armada et al. (2006), machos orquiectomizados apresentam menor ganho ponderal do que animais submetidos a falsa-orquiectomia (Sham), mantendo este catabolismo até oito meses após a castração (Veloso et al., 2008).

Os mesmos achados foram verificados neste estudo, onde a menor evolução ponderal foi obtida pelo grupo de machos castrados G7 e G8. Do mesmo modo foi observado catabolismo no grupo G11, de animais com dieta isocalórica e não castrados. Todavia, estes foram submetidos à baixa ingestão alimentar e maior gasto energético quando comparado aos grupos submetidos à dieta alcoólica (G7 e G10), onde foi observada letargia, com repouso excessivo, redução da

capacidade sensorial e, segundo Jéquier (1999), aumento de até 15% da termogênese.

Por consequência, é possível que a baixa ingestão alimentar tenha provocado catabolismo nos animais, e que o grupo G10 não tenha sofrido esta redução ponderal pois a letargia sofrida por estes animais pode ter preservado seu gasto energético.

O efeito da deficiência androgênica nos parâmetros antropométricos ainda é um assunto controverso. Diferente dos resultados obtidos neste trabalho, determinados autores constataram que o hipogonadismo reduz a massa muscular sem alterar significativamente o peso corpóreo tanto em humanos (Snyder et al., 1999) como em animais (Vanderschueren et al., 2000).

Por outro lado, Nyquist et al. (2002), em um estudo com ratos machos submetidos ao consumo de solução alcoólica (15%) por 6 semanas, não observaram diferença na ingestão diária calórica entre os grupos de dieta alcoólica e dieta isocalórica. Dentre os resultados significativos, houve apenas uma redução na ingestão de água para o grupo com dieta alcoólica, corroborando com os resultados de baixa ingestão hídrica obtidos nos grupos G1, G4, G7 e G10, embora a concentração alcoólica para estes animais tenha sido de 20% e o tempo experimental de oito semanas.

Ainda no estudo de Nyquist et al. (2002), os autores não observaram diferença no comprimento femoral e tampouco observaram diferença significativa nos teste de propriedades biomecânicas realizadas na cabeça do fêmur dos ratos machos.

Nas ratas fêmeas desta pesquisa, o consumo de ração bem como o ganho de massa corpórea mostrou-se superior nos animais com deficiência hormonal (G3), sendo similar ao que ocorre nas mulheres com menopausa, onde a redução hormonal promove hiperfagia e maior ganho ponderal, revelando maior eficiência nutricional (Barrios et al., 2010). Na mesma análise, foi possível constatar uma retração no ganho

ponderal quando estes animais são submetidos à dieta alcoólica ou isocalórica, como ocorreu nos grupos G1, G2, G4 e G5.

Esses resultados também foram observados por Callaci et al., (2006), Jiang et al. (2007), Deco (2009) e Senra (2009), que descreveram em seus experimentos com ratas ovariectomizadas, o aumento progressivo de peso corpóreo até o final do experimento.

Segundo Barrios et al. (2010) e Gavaler e Rosenblum (2003), este ganho ponderal é decorrente da supressão dos hormônios ovarianos, que provoca a redução do consumo de energia basal e aumento ponderal geral, com ganho de massa magra e maior depósito adiposo visceral.

O gênero feminino é, na grande maioria das vezes, mais afetado pela osteoporose por resultar do efeito agudo da deficiência estrogênica e do efeito a longo prazo relacionado à idade. Neste contexto, a deficiência de estrogênio aumenta o recrutamento de osteoclastos, que por sua vez prolonga a fase de reabsorção óssea, alterando os espaçamentos medulares, contribuindo assim para um aumento da fragilidade óssea (Comelekoglu et al., 2007; Downey; Siegel, 2006).

Sabe-se que a fratura óssea pode ser causada por trauma, degeneração, fadiga ou doença. Muitos autores postulam que o que difere clinicamente a osteoporose da osteopenia é o elevado risco de fratura, que em humanos, ocorre primordialmente no fêmur, vértebras e pulso (Lacativa; Farias, 2006; Lewiecki; Borges, 2006). Estes locais estão relacionados por muitos autores, com a deficiência hormonal em mulheres, hipogonadismo masculino e consumo excessivo de etanol (Pinto Neto et al., 2002).

Alguns trabalhos alegam que diferentes regiões ósseas reagem à deficiência hormonal de formas distintas, sendo que locais com predominância cortical respondem com menor magnitude à depleção de estrógeno (Mosekilde et al., 1998; Liebschner, 2004).

Uma vez que a densitometria óssea é atualmente o padrão de diagnóstico individual mais usado para osteoporose, e que este se correlaciona fracamente com a osteopenia no osso cortical, postula-se que a fragilidade do osso cortical deva ser mensurada por mais de uma metodologia, como por exemplo, pelo conjunto fragilidade, quantidade e qualidade da hidroxiapatita (Junqueira, 2001; Lacativa; Farias, 2006).

A fragilidade óssea pode ser estimada por testes biomecânicos como o de flexão-compressão tanto na cabeça do fêmur, que é o local de maior fratura em humanos, quanto na região metafisária do osso (Turner; Burr, 1993; Broulik et al., 2009). Nesta pesquisa optou-se pelo ensaio na região de diáfise apesar de ser predominantemente cortical, pois um dos propósitos foi avaliar a propriedade biomecânica e a constituição iônica na mesma região do fêmur.

Em relação a este teste biomecânico, há na literatura grande variação de metodologias e resultados que dependem do osso utilizado, como fêmur (Senra, 2009), tíbia (Ammann; Rizzoli, 2003), vértebra (Callaci et al., 2006), além da região óssea (epífise, metáfise e diáfise) e das condições do teste (Liebschner, 2004).

O propósito do teste de flexão-compressão em três pontos foi determinar a relativa fragilidade do osso quando cargas de flexão e compressão eram aplicadas sobre o fêmur deformando-o até o ponto de ruptura. O osso, sob estas condições, tende a fraturar primeiro em tensão e propagar-se através da compressão, rompendo completamente de uma forma semelhante à asa de borboleta (Martynetz et al., 2010).

Outra consideração a ser feita sobre o teste de flexão-compressão em três pontos é em relação aos parâmetros analíticos utilizados como carga, velocidade, e da grande variabilidade biológica intragrupo, o que dificulta a comparação com a literatura científica existente (Schriefer et al., 2005; Silva, 2007; Senra, 2009). Com o intuito de minimizar os erros, tomaram-se por base alguns requisitos da norma

S459 publicada pela ASAE (American Society of Agricultural Engineers, 2007).

Para avaliar a fragilidade óssea, foram verificadas a carga máxima e a rigidez, e para avaliar a eficiência arquitetônica, foram analisados o módulo de elasticidade e a resistência máxima. Também foi mensurado o comprimento e o diâmetro femoral dos animais para considerar a homogeneidade da morfometria, uma vez que na resistência óssea do fêmur de ratos, o diâmetro é inversamente proporcional à espessura cortical (Ammann; Rizzoli, 2003; Felsenberg; Boonen, 2005).

De acordo com as medidas obtidas nas ratas fêmeas, houve variações nos parâmetros anatômicos de diâmetro femoral, sendo estes influenciados pela deficiência hormonal, revelando os diâmetros mais elevados nos grupos com deficiência hormonal G1 e G3. Para os outros parâmetros como carga máxima, rigidez, resistência máxima ou módulo de elasticidade, não foi observada relação, uma vez que os valores destes grupos experimentais não diferiram.

Ratas com baixa atividade de receptor beta de estrogênio demonstram aumento da mineralização óssea decorrentes do aumento da porção cortical, mais especificamente da porção radial associada ao aumento do diâmetro periosteal (Vanderschueren et al., 2004).

Duan et al. (1999), revelaram que na osteoporose ocorre um aumento do diâmetro ósseo, sobretudo na região cortical, tornando o osso relativamente mais resistente. Chen et al. (2003) também observaram em 35 pacientes na pós-menopausa e com alterações na tireóide, um aumento na formação de osso na superfície periosteal.

Neste sentido, acredita-se que seja um efeito secundário à deficiência hormonal, provocado pelo aumento de massa corporal, uma vez que foi observado menor diâmetro femoral no grupo G2, que também foi ovariectomizado, porém submetido à baixa ingestão alimentar e consumo calórico basal normal, o que de certa forma, também ocorreu no grupo G5.

Wardlaw (1996) e Zhao et al. (2007), acreditam que o aumento de massa corporal que, segundo os autores promove efeito piezométrico no osso, produzindo maior carga mecânica sobre a matriz osteóide, estimulando a remodelação óssea e o fortalecimento femoral. Em contraste com tantas consequências deletérias da obesidade, alguns autores crêem que o ganho ponderal pode ser fator protetor contra a osteoporose, tendo em vista que estes indivíduos apresentam maior DMO quando comparados aos pacientes eutróficos (Wang et al., 2005).

A repercussão na fisiologia óssea decorrente da ação piezométrico pode ser observada pelo aumento do diâmetro nos grupos com deficiência hormonal G3 e G1. Presumivelmente, este efeito foi capaz de interferir de forma expressiva na manutenção da biomecânica óssea, não permitindo que as variáveis dieta alcoólica e deficiência hormonal agissem de forma negativa na qualidade óssea.

Em um estudo de coorte de sete anos com 93.405 americanas idosas, divididas entre diabéticas e não-diabéticas, com dieta de cálcio e reposição hormonal controlada, foi observado que as pacientes diabéticas tinham DMO significativamente mais elevada (Bonds et al., 2006).

Associado a isso, é possível que haja uma pequena produção de estrógenos pelos adipócitos aumentados nas fêmeas com maior ganho ponderal, promovendo anabolismo ósseo e mantendo a resistência óssea perante o aumento das solicitações mecânicas fisiológicas (Bandeira, 2007).

Nos ratos machos, a deficiência androgênica promoveu redução significativa do comprimento femoral e na capacidade de resistir à carga nos grupos G7, G8 e G9. Atualmente, sabe-se que a geometria óssea masculina é afetada pela redução hormonal, e que o estrógeno, muito mais do que o andrógeno acarreta a baixa estatura e até mesmo aumento da fragilidade óssea (Center et al., 1999; Ohlsson; Vandenput, 2009).

A análise de rigidez femoral não apresentou comportamento uniforme intragrupo em nenhum dos gêneros, oferecendo informações inconsistentes para analisar as variáveis. A rigidez está relacionada com a capacidade de deformação imposta pela carga antes da ruptura do espécime, e as variações anatômicas e a anisotropia podem produzir grandes diferenças de resultados. Esta anisotropia, que é inerente à fisiologia óssea, está vinculada às fibras colágenas, que do mesmo modo promovem alterações nas propriedades biomecânicas (Holanda et al., 1999).

Concordando com achados de Hengsberger et al. (2005) e Senra (2009), a rigidez apresentou elevados coeficientes de variação intragrupo independente do gênero. Os autores acreditam que estas variações sejam mais decorrentes da anatomia do que derivadas da biomecânica óssea. No entanto, mesmo com elevado coeficiente de variação, foi possível observar redução nos valores do grupo G7, demonstrando que as variáveis deficiência hormonal e dieta alcoólica ocasionaram efeito deletério, reduzindo sinergicamente a resistência do fêmur.

Holanda et al. (1999), correlacionado as propriedades obtidas nos ensaios de flexão-compressão em três pontos com a composição e orientação das fibras colágenas do fêmur de coelhos notaram que a orientação das fibras teve forte correlação com a resistência biomecânica e com o módulo de elasticidade.

Análises em andamento com estes mesmos animais, utilizando a técnica de espectroscopia FT-Raman, demonstram baixa intensidade vibracional na banda característica de hidroxiapatita para os grupos G7 e G10 e também alterações na intensidade do pico de amida-I, característico de colágeno para o grupo G7 (Lodi et al., 2009).

O fêmur é um exemplo de material transversalmente isotrópico, pois possui o mesmo módulo de elasticidade em todas as direções transversais, contudo os maiores valores de módulo de

elasticidade são obtidos longitudinalmente no osso (Liebschner, 2004). Desta maneira, o osso é mais resistente na direção longitudinal do que na tangencial. Isso ocorre especialmente pelo fato dos ósteons serem orientados ao longo do eixo longitudinal do osso (Holanda et al., 1999).

O módulo de elasticidade da porção cortical do fêmur humano reduz cerca de 2% por década após os 35 anos. Já a resistência decai até 5% por década e a tenacidade reduz em aproximadamente 10% (Silva, 2007). Apesar do procedimento cirúrgico induzir deficiência hormonal nos ratos, compatível com a menopausa e a andropausa, não foi possível observar decréscimo dos valores de módulo de elasticidade e rigidez máxima entre os grupos experimentais.

Diferentemente do que ocorre em humanas idosas (Lane, 2006), nas ratas fêmeas com deficiência hormonal (grupos G1, G2 e G3), apesar da modificação acentuada na estequiometria da hidroxiapatita femoral, não foi observado aumento da fragilidade óssea em nenhum dos parâmetros de análises de propriedades biomecânicas extrínsecas ou intrínsecas do fêmur.

Zhang et al. (2007), também afirmaram que a ovariectomia não produziu alterações na carga máxima, deformação e rigidez da diáfise femoral de ratas após 4 meses de ovariectomia, contudo, na metáfise proximal da tíbia, onde há presença de trabeculado ósseo, foi observada redução da porção trabecular em 34% após 4 semanas e 28.1% após 18 semanas de deficiência hormonal.

A propriedade biomecânica dos ossos dos machos só difere das fêmeas pelo tamanho, pois sua estrutura química e celular é muito semelhante (Silva, 2007). Considerando que, no geral, os ossos do gênero masculino são maiores que o feminino, é provável que o comprimento e o diâmetro femoral contribuam para a maior resistência e o menor risco de fraturas observadas nos machos quando comparados com as fêmeas no geral (Gennari et al., 2002). No entanto, os animais machos

(G7 a G11) foram aqueles que sofreram maior influência das variáveis estudadas, tendo perda da qualidade óssea frente aos testes biomecânicos.

Com relação às propriedades biomecânicas, o grau de mineralização e a composição dos cristais de hidroxiapatita parecem ser igualmente importantes para a resistência óssea (Metcalf, 2008). Neste estudo, apesar da pouca resposta biomecânica frente à deficiência hormonal e ao consumo crônico de etanol, testes mais sensíveis de qualidade óssea, como é o caso da quantificação mineral óssea por microfluorescência de raios-x, revelam na mesma posição do fêmur, diferenças expressivas na distribuição de cálcio e fósforo no osso.

Em relação à composição mineral óssea, pode-se dizer que em ambos os gêneros, o consumo de etanol foi a variável mais importante nas modificações da mineralização da hidroxiapatita do fêmur, uma vez que as concentrações de cálcio e Ca/P sempre estiveram abaixo do controle nos grupos submetidos a dieta alcoólica.

De uma maneira semelhante, o fósforo foi alterado pelo consumo de etanol, aumentando sua concentração óssea nos animais com dieta alcoólica, principalmente quando associado à deficiência hormonal, revelando um grande depósito de fósforo e perda de cálcio ósseo nos ratos machos quando comparados ao grupo controle (G12).

A hidroxiapatita estequiométrica apresenta uma razão molar de Ca/P de 1,67. No entanto, esta proporção pode estar alterada em algumas situações, pois as apatitas biológicas possuem variáveis que podem conter íons (CO_3 , HPO_4^{-2} , F, Cl, Mg, Na, K) ou sofrerem a substituição de cálcio por cátions como magnésio e sódio. Apesar da similaridade da composição, estas modificações são capazes de provocar grandes alterações na qualidade óssea, tanto pelo aumento da friabilidade quanto da dureza da estrutura óssea (LeGeros, 2002; Tzaphlidou et al., 2006; Oliveira et al., 2008).

Por causa da variabilidade da razão molar verificada por diversos autores, ainda é incógnita na literatura a distribuição mineral

fisiológica de cálcio e fósforo ao longo do fêmur de ratos, e também é desconhecida se há diferença na proporção molar de Ca/P nas distintas regiões ósseas. O que se sabe, é que a proporção Ca/P é um indicativo da mineralização óssea e quanto menor o valor desta proporção, menor é a mineralização desta estrutura (Tzaphlidou et al., 2006; Li et al., 2009).

Arnold et al. (2001), observaram nas estruturas dentárias de humanos valores 1,3 para a dentina intratubular e 2,3 para o esmalte. Valores intermediários de proporção molar de Ca/P (1,67) foram encontrados por Li et al. (2009) na cortical de fêmur bovino. Do mesmo modo, proporção de Ca/P (2,12) semelhantes também foram observados por Tzaphlidou et al. (2006) no fêmur de ratas de 1 ano e 6 meses.

Neste estudo, utilizando uma leitura longitudinal no fêmur foi verificada redução da proporção Ca/P em todos os grupos submetidos a dieta alcoólica, com valores de controle próximos a 1,76 para as fêmeas do grupo G6 e 1,94 para os machos do grupo G12. Valores muito inferiores foram observados nos grupos com dieta alcoólica e deficiência hormonal tanto de machos e fêmeas (G1, G4, G7 e G10), conotando acentuada alteração na estrutura da hidroxiapatita do fêmur.

À semelhança dos resultados obtidos neste trabalho, porém utilizando espectrometria associada à microscopia eletrônica de varredura Nagareddy e Lakshmana (2005), também observaram que ratas com deficiência hormonal apresentaram uma razão molar de Ca/P menor do que as ratas controle. Corroborando com estes dados, Senra (2009), em um estudo utilizando parâmetros de análise semelhante, verificou no calo ósseo de fêmures de ratas, valores médios de Ca/P de 2,12.

Vários compostos estão envolvidos na regulação do cálcio e, em muitos casos, afetam também os níveis de fosfato. Através de mecanismos distintos, o alcoolismo é capaz de alterar os três principais reguladores da homeostasia mineral óssea (Keiver, 2004; Moe, 2008).

A exposição crônica a altas concentrações de etanol pode acarretar atraso no crescimento e desenvolvimento ósseo (Keiver et al., 2005; Lauing et al., 2008), redução da remodelação e da resistência óssea (Turner, 2000; Chakkalakal et al., 2005), e piora na qualidade do reparo ósseo (Chakkalakal, 2005; Deco, 2009). Por causa desta relação entre etanol e osso, a ruptura do equilíbrio mineral ósseo pode refletir nos parâmetros bioquímicos de cálcio e fosfato ósseo e elevar o risco de osteoporose (Keiver et al., 2005).

Para avaliação bioquímica, foi utilizada a análise do cálcio iônico plasmático, pois seus valores não são influenciados quando há alteração na concentração de albumina sérica. Para o fósforo, foi utilizado o fosfato inorgânico, uma vez que o fósforo é um ânion primário pouco estável em fluido extracelular e que a pequena quantidade de fósforo orgânico extracelular encontra-se sob a forma de fosfolípidos e assim, não reflete sua concentração real (Fiske; Subbarow; 1925).

Alguns autores postulam que a hipocalcemia plasmática provocada pelo consumo elevado de etanol é transitória (Diez et al., 1997) e dependente da ação do PTH (Keiver et al., 2005). Sabe-se que o PTH é secretado numa taxa inversamente proporcional à concentração do cálcio, e que sob alcoolemia elevada, o sistema que regula esta homeostasia é rompido. Na realidade, este desequilíbrio é tão expressivo, que há na literatura relatos tanto de hiper quanto de hipoparatiroidismo secundário e transitório estabelecidos pelo alto consumo de etanol. Contudo, os autores concordam que, a partir deste desequilíbrio, o osso não responde mais adequadamente ao estímulo do PTH e em decorrência disso, possa surgir a tríade hipocalcemia, deficiência de calciferol (vitamina D) e hiperfosfatemia (Diez et al., 1997; Kayath et al., 1999; Iwasaki et al., 2006).

Neste caso, os valores de cálcio plasmático das ratas fêmeas não foram alterados pelo consumo de etanol, apesar dos dados relativos à hidroxiapatita do fêmur demonstrar que nos grupos submetidos

à dieta alcoólica (G1 e G4) houve modificação da concentração do cálcio e fósforo ósseo e rompimento da homeostasia mineral.

Ainda nesta análise, foi observado que o grupo de machos Sham submetido à dieta isocalórica (G11) obteve os menores valores de cálcio plasmático decorrente, possivelmente, da baixa ingestão alimentar que refletiu também na acentuada perda de massa corporal.

Através de outro mecanismo, a vitamina D também pode alterar a composição mineral óssea, pois ela atua na absorção gastrointestinal de cálcio e fosfato, e seu equilíbrio está ligado à síndrome de má absorção em pacientes alcoólicos. Também no intestino, a elevação do fosfato plasmático favorece a precipitação de sais de fosfato de cálcio, e a inibição do calciferol ocasionando a hipocalcemia. Além disso, o sítio primário da hidroxilação da vitamina D é o sistema microssomal hepático, e este mesmo sistema é utilizado até a exaustão pela oxidação alcoólica, justificando a menor produção de calcidiol (Moreira et al., 2004). Uma vez que a concentração plasmática destes minerais não refletiu o desequilíbrio ósseo, é possível que a eliminação renal de cálcio e fosfato possa ter alterado.

Enquanto o paratormônio, a calcitonina e a vitamina D são os principais reguladores da homeostasia mineral de cálcio e fosfato (Iwaniec et al., 2008; Moe, 2008), o estrógeno, os andrógenos, a tireóide e a paratireóide influenciam o metabolismo, controlando a remodelação celular óssea (Bland, 2000).

Serakides et al. (2005), em um estudo com 108 ratas com deficiência hormonal mantidas em hipertireoidismo por períodos de 30, 60 e 90 dias, observou que a ovariectomia isoladamente elevou os níveis plasmáticos de fosfato e tiroxina livre.

Por outro lado, Simsek et al. (2003) investigou em 30 ratas o efeito da osteoporose e do hipertireoidismo em vários parâmetros bioquímicos, dentre eles cálcio e fosfato. Após 10 semanas da ovariectomia o estradiol era indetectável, confirmando o sucesso da

instalação da osteoporose via ovariectomia, e os valores séricos de cálcio e fosfato não foram alterados pelo procedimento de ovariectomia.

Ainda é desconhecido se a hipocalcemia decorre da hiperfosfatemia progressiva ou que o inverso ocorre. As repercussões da deficiência hormonal incidem em órgãos e sistemas que podem ser dependentes entre si, dificultando a distinção entre os fatores causais e os intervenientes. Fujisawa et al. (2009) verificaram *in vitro*, que a hiperfosfatemia promove apoptose de osteoblastos cultivados da polpa dentária de incisivo de ratos, sendo este efeito dose-dependente e deletério para a qualidade óssea.

Por outro lado, o aumento da concentração plasmática de fósforo também interfere na qualidade óssea (Moe, 2008). Em uma revisão de literatura Lauer et al. (2006), relataram ser comum os casos de hipofosfatemia em pacientes alcoolizados, por consequência principalmente da fosfatúria, desnutrição e miopatias.

Ao contrário do que foi relatado pelos pesquisadores acima citados, neste estudo, foi observado hiperfosfatemia nos machos do grupo G7, e somente os animais do grupo G9 apresentaram acentuada redução da concentração plasmática de fosfato, revelando que a deficiência hormonal, isoladamente, reduziu o fosfato no plasma dos animais sem, contudo, compensar com a elevação do cálcio.

Pesquisas com animais experimentais e consumo de etanol são desenvolvidas desde 1940, e mesmo depois de tantas décadas, ainda é desconhecido o completo mecanismo deletério desta substância nos sistemas orgânicos. Contudo, é de consenso entre os pesquisadores que o etanol consumido em altas concentrações e de forma crônica é capaz de modificar gravemente as estruturas moleculares e a homeostasia celular (Spanagel, 2000).

Mesmo entre indivíduos da mesma espécie ocorrem grandes variações fenotípicas que torna inviável a extrapolação completa de dados. Como neste caso foi utilizado o rato, um animal quadrúpede e

com características de ordem evolutiva diferente dos humanos, o ideal é que os resultados desta pesquisa experimental sejam um estímulo para novas investigações. Novas pesquisas devem prosseguir para preencher lacunas quanto aos efeitos da deficiência hormonal principalmente no gênero masculino, onde foram obtidos os dados mais significativos.

A partir dos resultados obtidos, sugere-se para pesquisas futuras a avaliação do colágeno, das aromatases óssea e hepática, além da micro-arquitetura trabecular e cortical por técnicas de microscopia de alta sensibilidade analítica.

7 CONCLUSÃO

Sob as condições experimentais realizadas, a análise dos resultados tornou possível concluir que:

- A deficiência hormonal causou condição nutricional positiva nas ratas fêmeas e negativa nos machos;
- A deficiência hormonal e a dieta alcoólica não alteraram as propriedades biomecânicas de ratas fêmeas, no entanto aumentaram a fragilidade óssea nos ratos machos;
- A concentração plasmática de cálcio de machos e fêmeas não foi modificada pela deficiência hormonal ou dieta alcoólica;
- A dieta alcoólica associada à deficiência hormonal promoveu hiperfosfatemia plasmática em machos e fêmeas, e a deficiência hormonal isoladamente causou hipofosfatemia nos ratos machos;
- A deficiência hormonal e a dieta alcoólica aumentaram a concentração de fósforo e reduziram o cálcio ósseo em machos e fêmeas;
- A composição da hidroxiapatita óssea foi alterada pela deficiência hormonal associada à dieta alcoólica nos machos e fêmeas.

8 REFERÊNCIAS*

Ahmad S, Rohrbaugh JW, Anokhin AP, Sirevaag EJ, Goebel JA. Effects of lifetime ethanol consumption on postural control: a computerized dynamic posturography study. *J Vestib Res.* 2002;12(1):53-64.

Alexander C. Idiopathic osteoporosis: an evolutionary dys-adaptation? *Ann Rheum Dis.* 2001;60:554-8.

Alonso JMSL. Influência do consumo crônico de etanol 20% na periodontite induzida em ratas com deficiência hormonal [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2009.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4. ed. Washington DC: American Psychiatric Association Press; 1994.

American Society of Agricultural Engineers. S459: shear and three-point bending test of animal bone. ASAE standards 2007: standards engineering practices data. San Joseph, 2007. p.669-71.

Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int.* 2003;14(3):S13-8.

Antonioli E, Cardoso AB, Carvalho HF. Effects of long-term castration on the smooth muscle cell phenotype of the rat ventral prostate. *J Androl.* 2007;28(5):777-83.

*Baseado em:

Internacional Comitê de Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: simple referents [homepage na Internet]. Bethesda: US National Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Armada L, Nogueira CR, Neves UL, dos Santos Souza P, Detogne JP, Armada-Dias L, et al. Mandible analysis in sex steroid-deficient rats. *Oral Diseases*. 2006;12(2):181–6.

Arnold WH, Konopka S, Gaengler P. Qualitative and quantitative assessment of intratubular dentin formation in human natural carious lesions. *Calcif Tissue Int*. 2001;69(5):268-73.

Associação Brasileira de Medicina de Tráfego. Blood alcohol concentration and safe automobile driving. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54(5):383-5.

Augustynska B, Ziolkowski M, Odrowaz-Sypniewska G, Kielinski A, Gruszkai M, Kosmowski W. Menstrual cycle in women addicted to alcohol during the first week following drinking cessation: Changes of sex hormones levels in relation to selected clinical features. *Alcohol Alcohol*. 2007;42(2):80-3.

Ayesta EJ. Bases bioquímicas y neurobiológicas de la adicción al alcohol. *Adicciones*. 2002;14(1):63-78.

Bagnardi V, Blangiardo M, Vecchia CL, Corrao G. Alcohol consumption and the risk of cancer. *Alcohol Res Health*. 2001;25(4):263-70.

Bandeira F. A obesidade realmente fortalece os ossos? *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2007;51(6):895-7.

Baranowska I, Barchánski L, Bak M, Smolec B, Mzyk Z. X-ray fluorescence spectrometry in multielemental analysis of hair and teeth. *Pol J Environ Stud*. 2004;13(6):639-46.

Barrios Y, Díaz N, Meertens L, Naddaf G, Solano L, Fernández M, et al. Leptina sérica, su relación con peso y distribución de grasa corporal en mujeres posmenopáusicas. *Nutr Hosp*. 2010;25(1):80-4.

Baum E, Peters KM. The diagnosis and treatment of primary osteoporosis according to current guidelines. *Dtsch Arztebl Int*. 2008;105(33):573–82.

Bay-Jensen AC, Tabassi NC, Sondergaard LV, Anderson TL, Dagnaes-Hansen F, Garnero P, et al. The response to oestrogen deprivation on cartilage collagen degradation markers; CTX-II is unique compared to other markers of collagen turnover. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(1):1-12.

Berg KM, Kunins HV, Jackson JL, Nahvi S, Chaudhry A, Harris KA, et al. Association between alcohol consumption and both osteoporotic fracture and bone density. *Am J Med*. 2008;121:406-18.

Bland R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin Sci*. 2000;98(2):217-40.

Blouin S, Gallois Y, Moreau MF, Baslé MF, Chappard D. Disuse and orchidectomy have additional effects on bone loss in the aged male rat. *Osteoporos Int*. 2007;18(1):85-92.

Bonds DE, Larson JC, Schwartz AV, Strotmeyer ES, Robbins J, Rodriguez BL, et al. Risk of fractures in women with type 2 diabetes: the Womens Health Initiative Observational Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3404-10.

Bonjour JP, Ammann P, Rizzoli R. Importance of preclinical studies in the development of drugs for treatment of osteoporosis: a review related to the 1998 WHO guidelines. *Osteoporos Int*. 1999;9(5):379-93.

Borges TT, Rombaldi AJ, Knuth AG, Hallal PC. Conhecimento sobre fatores de risco para doenças crônicas: estudo de base populacional. *Cad Saúde Pública*. 2009; 25(7):1511-20.

Botelho AP, Santos-Zago LF, Reis SMPM, Oliveira AC. A suplementação com ácido linoléico conjugado reduziu a gordura corporal em ratos Wistar. *Rev Nutr*. 2005;18(4):561-5.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil – Subchefia para Assuntos Jurídicos. Lei 11705 de 19/06/2008. Diário Oficial da União de 20/06/2008.

Briggs AM, Greig AM, Wark JD. The vertebral fracture cascade in osteoporosis: a review of aetiopathogenesis. *Osteoporos Int.* 2007;18(5):575-84.

Brodie MS, Scholz A, Wiger TM, Dopico AM. Ethanol interactions with calcium-dependent potassium channel. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007;31(10):1625-32.

Bronckers ALJJ, Goei W, Van Heerde WL, Dumont EAWJ, Reutelingsperger CPM, Van den Eijnde SM, et al. Phagocytosis of dying chondrocytes by osteoclast in the mouse growth plate as demonstrated by annexin-V labeling. *Cell Tissue Res.* 2000;301(2):267-72.

Broulik PD, Rosenkrancová J, Růžička P, Sedláček R, Zíma T. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. *Physiol Res.* 2009 Nov 20. [Epub ahead of print].

Burger EH, Klein-Nulend J. Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro. *Adv Dent Res.* 1999;13(1):93-8.

Calero JA, Curiel MD, Moro MJ, Carrascal MT, Santana JSR, Avial MR. Speed of sound, bone mineral density and bone strength in oophorectomized rats. *Eur J Clin Invest.* 2000;30(3):210-4.

Callaci JJ, Himes R, Lauing K. Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. *Calcif Tissue Int.* 2009;84(6):474-84.

Callaci JL, Juknelis D, Patwardhan A, Sartori M, Frost N, Wezeman FH. The effects of binge alcohol exposure on bone resorption and biomechanical and structural properties are offset by concurrent bisphosphonate treatment. *Alcoholism Clin Exp Res.* 2004;28(1):182-91.

Callaci JL, Juknelis D, Patwardhan A, Wezeman FH. Binge alcohol treatment increases vertebral bone loss following ovariectomy: compensation by intermittent parathyroid hormone. *Alcoholism Clin Exp Res.* 2006;10(4):665-72.

Carbonare LD, Valenti MT, Bertoldo F, Zanatta M, Zenari S, Realdi G. Bone microarchitecture evaluated by histomorphometry. *Micron*. 2005;36(7-8):609-16.

Carvalho FG, Puppim-Rontani RM, Soares LES, Santo AME, Martin AA, Nociti-Junior F. Mineral distribution and CLSM analysis of secondary caries inhibition by fluoride/MDPB-containing adhesive system after cariogenic challenges. *J Dent*. 2009;37(4):307-14.

Center JR, Nguyen TV, Sambrook PN, Eisman JA. Hormonal and biochemical parameters in the determination of osteoporosis in elderly men. *J Clin End Metab*. 1999;84(10):3626-36.

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.

Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, McVicker DL, Lybarger DL, et al. Inhibition of bone repair in a rat model for chronic and excessive alcohol consumption. *Alcohol*. 2005;36(3):201-14.

Chakkalakal DA. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res*. 2005;29(12):2077-2090.

Chen Q, Kaji H, Iu M-F, Nomura R, Sowa H, Yamauchi M, et al. Effects of an excess and a deficiency of endogenous parathyroid hormone on volumetric bone mineral density and bone geometry determined by peripheral quantitative computed tomography in female subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(10):4655-8.

Chen Y, Heiman ML. Increased weight gain after ovariectomy is not a consequence of leptin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;20(2):315-22.

Christodoulou CC. What is osteoporosis? *Postgrad Med J*. 2003;79(929):133-8.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3:S131-9.

Close JCT, Hopper R, Glucksman R, Jackson SHD, Switt CG. Predictors of falls in a high risk population: results from the prevention of falls in the elderly trial (PROFET). *Emerg Med J*. 2003;20(5):421-5.

Cole ZA, Dennison EM, Cooper C. The impact of methods for estimating bone health and the global burden of bone disease. *Salud Pública Méx*. 2009;51(1):S38-45.

Comelekoglu U, Mutlu H, Yalin S, Bagis S, Yildiz A, Ogenler O. Determining the biomechanical quality of normal and osteoporotic bones in rat femora through biomechanical test and finite element analysis. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2007;41(1):53-7.

Compagnucci GE, Compagnucci CV, Olivera MI, Roig MC, Mandalunis P, Morgazo C et al. Posible regulación neural y/o humoral de la aptitud biomecánica del esqueleto apendicular en un modelo de desnutrición leve y crónica. *RAO*. 2007;6(1):4-14.

Cunha P, Novaes MA. Avaliação neurocognitiva no abuso e dependência do álcool: implicações para o tratamento. *Rev Bras Psiquiatr*. 2004;26(1):23-7.

Cunningham CL, Fidler TL, Hill KG. Animal models of alcohol's motivational effects. *Alcohol Res Health*. 2000;24(2):85-92.

Cunningham CC, Van Horn CG. Energy availability and alcohol-related liver pathology. *Alcohol Res Health*. 2003;27(4):291-9.

Dai J, Lin D, Zhang J, Habib P, Smith P, Murtha J, et al. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 mice. *J Clin Invest*. 2000;106(7): 887-95.

Davis JM, Newbury DE. Milli-x-ray fluorescence x-ray spectrum imaging: problem solving through mapping on the centimeter scale. *Microsc Microanal*. 2008;14(2):1084-5.

Deco CP. Influência da osteoporose e álcool na osseointegração em ratas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2009.

Delmas PD, Li Z, Cooper C. Relationship between changes in bone mineral density and fracture risk reduction with antiresorptive drugs: some issues with meta-analyses. *J Bone Miner Res.* 2004;19(2):330–7.

Diez A, Serrano S, Cucurull J, Mariñoso L, Bosch J, Puig J, et al. Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-Dawley rats. *Calcif Tissue Int.* 1997;61(2):168-71.

Dolganiuc A, Szabo G. *In vitro* and *in vivo* models of acute alcohol exposure. *World J Gastroenterol.* 2009;15(10):1168-77.

Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther.* 2006;86(1):77-91.

Draper LR, Gyure LA, Hall JG, Robertson D. Effect of alcohol on the integrity of the intestinal epithelium. *Gut.* 1983;24(5):399-404.

Edenberg HJ. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. *Alcohol Res Health.* 2007;30(1):5-13.

Eihorn TA. Bone strength: the botton line. *Calcif Tissue Int.* 1992;51(5):333-9.

Epstein EE, Fischer-Elber K, Al-Otaiba Z. Women, aging, and alcohol use disorders. *J Women Aging.* 2007;19(1-2):31-48.

Epstein EE. Is cortical bone hip? What determines cortical bone properties? *Bone.* 2007; 41(1):S3-8.

Escribano AJJ, Parra GD. Diferencias de género en la enfermedad alcohólica. *Adicciones.* 2007;19(4):383-92.

Faloni APS, Cerri PS. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. *Rev Odont UNESP.* 2007;36(2):181-8.

Felsenberg D, Boonen S. The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clin Ther.* 2005;27(1):1-11.

Feng X. Chemical and biochemical basis of cell-bone matrix interaction in health and disease. *Curr Chem Biol.* 2009;3(2):189–96.

Fernandes JA. Sobriedade e embriaguez: a luta dos soldados de Cristo contra as festas dos tupinambás. *Tempo.* 2007;11(22):98-121.

Fernández-Solà J, Nicolás-Arfelis JM. Gender differences in alcoholic cardiomyopathy. *J Dend Specif Med.* 2002;5(1):41-7.

Ferner RE, Chambers J. Alcohol intake: measure for measure. *BMJ.* 2001;323(7327):1439-40.

Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *The J Biol Chem.* 1925;66(2):375-400.

Fujisawa R, Mizuno M, Tamura M. Effect of dentin phosphoprotein on phosphate-induced apoptosis of odontoblast-like cells. *Cells Tissues Organs.* 2009;189(1-4):60-4.

Gali JC. Osteoporose. *Acta Ortop Bras.* 2001;9(2):3-12.

Garcia-Florez M, Oliveira CA, Carvalho HF. Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. *Braz J Med Biol Res.* 2005;38(4):487-97.

García-Moreno LM, Capilla A, García-Sánchez O, Luque J, Senderek K, Conejo NM, et al. Alcohol tolerance in rats submitted to different periods of chronic and acute ethanol intake. *Psicothema.* 2004;16(2):211-6.

Gavaler J, Rosenblum E. Predictors of postmenopausal body mass index and waist hip ratio in the Oklahoma Postmenopausal Health Disparities Study. *J Am Coll Nutr.* 2003;22(4):269-76.

Gemma S, Vichi S, Testai E. Individual susceptibility and alcohol effects: biochemical and genetic aspects. *Ann Ist Super Sanità.* 2006;42(1):8-16.

Gennari L, Becherini L, Falchetti A, Masi L, Massart F, Brandi ML. Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002;81(1):1-24.

Gennari L, Merlotti D, Martini G, Gonnelli S, Franci B, Campagna S, et al. Longitudinal association between sex hormone levels, bone loss, and bone turnover in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(11):5327-33.

Gifford NA, Espaillet MP, Gatley SJ. Biodistribution of radiolabeled ethanol in rodents. *Drug Metab Dispos.* 2008;36(9):1853-8.

Gigliotti A, Bessa MA. Alcohol dependence syndrome: diagnostic criteria. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004;26(1):11-3.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature.* 2003;423(6937):349-55.

Hazenberg JG, Taylor D, Lee TC. The role of osteocytes and bone microstructure in preventing osteoporotic fractures. *Osteoporos Int.* 2007;18(1):1-8.

Heaney RP. Calcium intake and disease prevention. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(4):685-93.

Hengsberger S, Ammann P, Legros B, Rizzoli R, Zysset P. Intrinsic bone tissue properties in adult rat vertebrae: modulation by dietary protein. *Bone.* 2005;36(1):134-41.

Henriksen K, Leeming DJ, Byrjalsen L, Nielsen RH, Sorensen MG, Dziegiel MH, et al. Osteoclasts prefer aged bone. *Osteoporos Int.* 2007;18(6):751-9.

Henriques GS, Simeone MLF, Amazonas MALA. Avaliação in vivo da qualidade protéica do champignon do Brasil (*Agaricus brasiliensis* Wasser et al.). *Rev Nutr.* 2008;21(5):535-43.

Herbst KL, Bhasin S. Testosterone action on skeletal muscle. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004;7(3):271-7.

Hernandez CJ, Keaveny TM. A biomechanical perspective on bone quality. *Bone*. 2006;39(6):1173-81.

Hernandez CJ. Review how can bone turnover modify bone strength independent of bone mass? *Bone*. 2008;42(6):1014-20.

Hogan HA, Argueta F, Moe L, Nguyen LP, Sampson HW. Adult-onset alcohol consumption induces osteopenia in female rats. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(5):746-54.

Holanda AJ, Volpon JB, Shimano AC. Efeitos da orientação das fibras de colágeno nas propriedades mecânicas de flexão e impacto dos ossos. *Rev Bras Ortop*. 1999;34(11-12):579-84.

Ignacio DL, Frankenfeld TGP, Fortunato RS, Vaisman M, Werneck-de-Castro JPS, Carvalho DP. Regulação da massa corpórea pelo estrogênio e pela atividade física. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53(3):310-7.

Ilich JZ, Kerstetter JE. Nutrition in bone health revisited: a story beyond calcium. *JACN*. 2000;19(6):715-37.

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.

Iwasaki Y, Yamato H, Nii-Kono T, Fujeda A, Uchida M, Hosokawa A, et al. Insufficiency of PTH action on bone in uremia. *Kidney Int Suppl*. 2006;102:S34-6.

Jarvinen TLN, Kannus P, Sivanen H, Jolma P et al. Randomized controlled study of effects of sudden impact loading on rat femur. *J Bone Miner Res*. 1998;13(9):1475-82.

Jee WSS, Yao W. Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskel Neuron Interact*. 2001;1(3):193-207.

Jéquier E. Alcohol intake and body weight: a paradox? *Am J Clin Nutr*. 1999;69(2):173-4.

Jiang SD, Shen C, Jiang LS, Dai L-Y. Differences of bone mass and bone structure in osteopenic rat models caused by spinal cord injury and ovariectomy. *Osteoporos Int.* 2007;18(6):743-50.

Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009.

Junqueira PAA, Fonseca AM, Aldrigui JM. Osteoporose: diretrizes futuras. *Rev Assoc Med Bras.* 2001;47(1):14.

Kanis JA, Johansson H, Johnell O, Oden A, de Laet C, Eisman JA. Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int.* 2005;16(7):737-42.

Kayath MJ, Argentoni M, Vieira JGH. Hipocalcemia e síndrome convulsiva em alcoólatras - uma associação freqüentemente não diagnosticada. *Rev Assoc Med Bras.* 1999;45(1):24-6.

Keer WC, Greenfield TK, Tujague J, Brown SE. A drink is a drink? Variation in the amount of alcohol contained in beer, wine and spirits drinks in a US methodological sample. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005;29(11):2015-21.

Keiver K, Duggal S, Simpson ME. Ethanol administration results in a prolonged decrease in blood ionized calcium levels in the rat. *Alcohol.* 2005;37(3):173-8.

Keiver K. Ethanol interferes with the measurement of extracellular ionized calcium. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28(1):153-9.

Kolácná L, Bakesová J, Varga F, Kostakova E, Planka L, Necas A, et al. Biochemical and biophysical aspects of collagen nanostructure in the extracellular matrix. *Physiol Res.* 2007;56(1):S51-60.

Koshihara M, Katsumata S-I, Ushara M, Suzuki K. Effects of dietary phosphorus intake on bone mineralization and calcium absorption in adult female rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69(5):1025-8.

Kovacs E, Messingham KAN. Influence of alcohol and gender on immune response. *Alcohol Res Health*. 2002;26(4):257-63.

Lacativa PGS, Farias MLF. Office practice of osteoporosis evaluation. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50(4):674-84.

Lane NE, Yao W. Developments in the scientific understanding of osteoporosis. *Arthritis Res Ther*. 2009;11(3):228-36.

Lane NE. Epidemiology, etiology and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(83):S3-11.

Laranjeira R, Romano M. Brazilian consensus on public policies on alcohol. *Rev Bras Psiquiatr*. 2004;26(1):68-77.

Laranjeira R, Pinsky I, Zaleski M, Caetano R. I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas; 2007.

Lauar JT, Araújo LHL, Fialho EL, Gazolla MVB, Miguel RCC. Associação entre hipofosfatemia e alcoolismo. *J Bras Gastroenterol*. 2006;6(1):38-40.

Laughlin GA, Barrett-Connor E, Bergstrom J. Low serum testosterone and mortality in older man. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(1):68-75.

Lazzaretti C, Antunes MV, Silva CC, Borsoi M, Ardenghi PG, Suyenaga ES, et al. Comparação da resposta inflamatória aguda entre animais machos e fêmeas da linhagem Wistar. *Estudos*. 2008;35(11-12):1151-67.

Lee H, Finkelstein JS, Miller M, Comeaux SJ, Cohen RI, Leder BZ. Effects of selective testosterone and estradiol withdrawal on skeletal sensitivity to parathyroid hormone in men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(3):1069-75.

LeGeros R.Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;1(395):81-98.

Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006;85(7):584-95.

Lévesque D, Di Paolo T. Effect of the rat estrous cycle at ovariectomy on striatal D-1 dopamine receptors. *Brain Research Bulletin.* 1990;24(2):281-4.

Lewiecki EM, Borges JLC. Bone density testing in clinical practice. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2006;50(4):586-95.

Li D, Bi L, Meng G, Wang J, Lv R, Liu M, et al. Mineral status and mechanical properties of cancellous bone exposed to hydrogen peroxide for various time periods. *Cell Tissue Bank.* 2009 Oct 7. [Epub ahead of print] doi 10.1007/s10561-009-9161-0.

Licata A. Bone density vs bone quality: What's a clinician to do? *Cleve Clin J Med.* 2009;76(6):331-6.

Lieber CS, Jones DP, Decarli LM. Effects of prolonged ethanol intake: Production of fatty liver despite adequate diets. *J Clin Invest.* 1965;44(6):1009-21.

Lieber CS. Alcohol and hepatitis C. *Alcohol Res Health.* 2001;23(4):243-246.

Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol.* 2004;34(1):9-19.

Lieber CS. Relationship between nutrition, alcohol use and liver disease. *Alcohol Res Health.* 2003;27(3):220-31.

Liebschner MAK. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials.* 2004;25(9):1697-714.

Liu H, Paige NM, Goldzweig CL, Wong E, Zhou A, Suttorp MJ, et al. Screening for osteoporosis in men: a systematic review for an American College of Physicians Guideline. *Ann Intern Med.* 2008;148(9):685-702.

Lodi KB, Silva JR, Carvalho CS, Rocha RF, Santo AME. Characterization of mineral contents on androgen deficient and chronic ethanol consuming rats by biochemistry and non-destructive techniques. 2009. Papers Contributing to the 9th International Congress of Andrology. Medimond International Proceedings; 2009 March 7-10; Barcelona, Spain. Bologna: Monduzzi Editore; 2009. p. 89-94.

Lopes MHI, Francisconi CF. Conseqüências da ingestão de álcool etílico no estado nutricional dos pacientes. R AMRIGS. 1992;36(1):25-9.

Lorenzo J, Horowitz, Yongwon C. Osteoimmunology: interactions of the bone and immune system. Endocr Rev. 2008;29(4):403-40.

Loveridge N. Bone: more than a stick. J Anim Sci. 1999; 77:190-6.

Low PA. Prevalence of orthostatic hypotension. Clin Auton Res. 2008;18(1):8-13.

Lu Y, Cedenbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. Free Rad Biol Med. 2008;1(44):723-38.

Madeo B, Zirilli L, Caffagni G, Diazzi C, Sanguanini A, Pignatti E, et al. The osteoporotic male: Overlooked and undermanaged? Clin Interv Aging. 2007;2(3) 305-12.

Maio R, Dichi JB, Burini RC. Consequências nutricionais da alterações metabólicas dos macronutrientes na doença hepática crônica. Arq Gastroenterol. 2000;37(1):52-7.

Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroid and bone. Recent Prog Horm Res. 2009;57:385-409.

Marques ACPR. O uso do álcool e a evolução do conceito de dependência de álcool e outras drogas e tratamento. Rev IMESC. 2001;3(2):73-86.

Martinez FE, Garcia PG, Padovani PR, Cagnon VHA, Martinez M. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. The Prostate. 1993;22(4):317-24.

Martynetz FA, Biondo-Simões MLP, Martynetz JR, Martynetz TD, Zimerman E, Mello Neto H. Avaliação tomográfica e tensiométrica de fêmures de ratas ooforectomizadas submetidas à terapia de reposição hormonal. *Rev Bras Ortop.* 2010;45(1):40-5.

Matsumoto E. Estudo da contaminação ambiental atmosférica e de águas superficiais, empregando a fluorescência de raios-x dispersiva em energia (ED-XRF) e reflexão total (TXRF) [tese]. Campinas: Faculdade de Engenharia Civil, Universidade Estadual de Campinas; 2001.

Metcalfe D. The pathophysiology of osteoporotic hip fracture. *MGM.* 2008;11(1):51-7.

Mezey E. Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *Am J Clin Nutr.* 1980;69(2):2709-18.

Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutrition Journal.* 2007;6(27):1-8.

Moayyeri A, Kaptoge S, Luben RN, Wareham NJ, Bingham, Reeve J. Estimation of absolute fracture risk among middle-aged and older men and women: the EPIC-Norfolk population cohort study. *Eur J Epidemiol.* 2009;24(5):259-66.

Moe SM. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care.* 2008;35(2):215-vi.

Money SR, Petronianu A, Kimura K, Jaffe BM. Acute hypocalcemic effects of ethanol in dogs. *Alcoholism Clin Exp Res.* 1989;13(3):453-6.

Moraes E, Campos GM, Figlie NB, Laranjeira RR, Ferraz MB. Conceitos introdutórios de economia da saúde e o impacto social do abuso de álcool. *Rev Bras Psiquiatr.* 2006;28(4):321-5.

Moreira RO, Duarte MPC, Farias MLF. Distúrbios do eixo cálcio-PTH-vitamina D nas doenças hepáticas crônicas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004;48(4):443-50.

Mosekilde L, Thomsen JS, Orhii PB, Kalu DN. Growth hormone increases vertebral and femoral bone strength in osteopenic, ovariectomized, aged rats in a dose-dependent and site-specific manner. *Bone*. 1998;23(4):343-52.

Nagareddy PR, Lakshmar M. Assessment of experimental osteoporosis using CT-scanning, quantitative X-ray analysis and impact test on calcium deficient ovariectomized rats. *J Pharmacol Toxicol Meth*. 2005;52(3):350-5.

Nagata N, Bueno MIMS, Peralta-Zamora PG. Métodos matemáticos para correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios-x. *Quim Nova*. 2001; 24(4):531-9.

Nalla RK, Kruzic JJ, Ritchie RO. On the origin of the toughness of mineralized tissue: microcracking or crack bridging? *Bone*. 2004;34(5):790-8.

Nelson DL, Cox MM. *Lehninger principles of biochemistry*. 4. ed. New York: Worth Publishers; 2004.

Netto CC, Franco M, Cunha MSCA, Miyasaka CK. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporose. *R Ci Med Biol*. 2006;5(3):231-8.

Nordin BEC. The definition and diagnosis of osteoporosis. *Salud Pública Méx*. 2009;51(1):S132-3.

Novoa AV, Muthana AA, Rosés RP, Ortega MEM, Farnés OC. Concentraciones séricas de cálcio y magnésio em alcoólicos durante el tratamiento de desintoxicación. *Rev Cubana Aliment Nutr*. 1998;12(1):29-34.

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.

Ocarino NM, Gomes MG, Melo EG, Serakides R. Técnica histoquímica aplicada ao tecido ósseo desmineralizado e parafinado para o estudo do osteócito e suas conexões. *J Bras Patol Med Lab.* 2006; 42(1):37-9.

Ohlsoon C, Vandemput L. The role of estrogens for male bone health. *Eur J Endocrinol.* 2009;160(6):883-9.

Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, et al. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinol.* 2002;143(6):2349-56.

Olive MF, Koenig HN, Nannini MA, Hodge CW. Stimulation of endorphin neurotransmission in the nucleus accumbens by ethanol, cocaine, and amphetamine. *Journal Neurosc.* 2001;21(23):RC184.

Oliveira R, Santo AME, Soares LES, Martins AA. Avaliação dos componentes inorgânicos da dentina após condicionamento para procedimentos adesivos por fluorescência de raios-x. *Exacta.* 2008;6(1):139-46.

Omelon S, Georgiou J, Henneman ZJ, Wise LM, Sukhu B, Hunt T, et al. Control of vertebrate skeletal mineralization by polyphosphates. *PlosONE.* 2008;4(5):1-16.

Organização Mundial da Saúde. Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10. 10. ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1993.

Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. NIH Consensus Statement. 2000;27-29;17(1):1-36. [acessado em 10/05/2009]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=hstat4.chapter.20225>.

Otero RM, Cortés JR. Nutrición y alcoholism crônico. *Nutr Hosp.* 2008;23(2):3-7.

Pastore K. Futuro frágil. Pesquisa internacional revela que médicos e pacientes não sabem tratar a osteoporose. *Revista Veja.* ed.1658, 19/07/2000. [acessado em 20/03/2009]. Disponível em: http://veja.abril.com.br/190700/p_104.html.

Paton A. Alcohol in the body. *BMJ*. 2005;330(7482):85-7.

Paulson QX, Hong J, Holcomb VB, Nunez NP. Effects of body weight and alcohol consumption on insulin sensitivity. *Nutr J*. 2010;22;9(1):14.

Pepersack T, Fuss M, Otero J, Bergmann P, Valsamis J, Corvilain J. Longitudinal study of bone metabolism after ethanol withdrawal in alcoholic patients. *J Bone Miner Res*. 1992;7(4):383-7.

Piano MR, Carrigan TM, Schewertz DW. Sex differences in ethanol liquid diet consumption in Sprague-dawley rats. *Alcohol*. 2005;35(2):113-8.

Pinheiro MM, Ciconelli RM, Martini LA, Ferraz MB. Clinical risk for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis study (BRAZOS). *Osteoporos Int*. 2009;20(3):399-408.

Pinto Neto AM, Soares A, Urbanetz AA, Souza ACA, Ferrari AEM, Amaral B, et al. Consenso Brasileiro De Osteoporose 2002. *Rev Bras Reumatol*. 2002;42(6):343-54.

Ponnappa BC, Rubin E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. 2000;24(2):93-104.

Qaseem A, Snow V, Shekelle P, Hopkins Jr.R, Forciea MA, Owens DK. Screening for osteoporosis in men: a clinical practice guideline from the American College of Physicians. *Ann Intern Med*. 2008;148(9),680-4.

Quarles LD. Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation. *J Clin Invest*. 2008;118(12):3820-8.

Ramadoss J, Hogan HA, Given JC, West JR, Cudd TA. Binge alcohol exposure during all three trimesters alters bone strength and growth in fetal sheep. *Alcohol*. 2006;38(3):185-92.

Ramalho AC, Lazaretti-Castro M. Fisiopatologia da osteoporose involutiva. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1999;43(6):409-14.

Ramalho ACR, Lazaretti-Castro M, Cohen-Solal ME, Vernejoul MC. Por que estrógeno e raloxifeno melhoram a densidade mineral óssea? Mecanismo de ação do estrógeno e de um modulador seletivo do receptor de estrógeno (SERM) no osso. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2000;44(6):471-82.

Ramos SP, Woitowitz AB. Da cervejinha com os amigos à dependência de álcool: uma síntese do que sabemos sobre esse percurso. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004;26(1):18-22.

Ribeiro AFC, Serakides R, Nunes VA, Silva CM, Ocarino NM. A osteoporose e os distúrbios endócrinos da tireóide e das gônadas. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(3):228-36.

Riera-Espinoza G. Epidemiology of osteoporosis in Latin America 2008. *Salud Pública Méx.* 2009;51(1):S52-5.

Rigo JC, Rigo JFO, Faria BC, Stein A, Santos VM. Trauma associado com uso de álcool em idosos. *Brasília Med.* 2005;42(1-2):35-40.

Rocha RF. Influência do consumo crônico de álcool no fêmur de ratos machos e fêmeas. [tese de livre-docência]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2005.

Rodrigues RAP, Scudeller PG, Pedrazzi EC, Schiavetto FV, Lange C. Morbidade e sua interferência na capacidade funcional de idosos. *Acta Pau Enferm.* 2008;21(4):643-8.

Ruppel ME, Miller LM, Burr DB. The effect of the microscopic and nanoscale structure. *Osteoporos Int.* 2008;19(9):1251-65.

Sampson HW. Alcohol and other factors affecting osteoporosis risk in women. *Alcohol Res Health.* 2002;26(4):292-8.

Sampson HW. Alcohol, osteoporosis, and bone regulating hormones. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997;21(3):400-3.

Santolaria F, Perez-Manzano JL, Milena A, González-Reimers E, Gomez-Rodriguez MA, Martinez-Riera A, et al. Nutritional assessment in alcoholic patients. Its relationship with alcoholic intake, feeding habits, organic complications and social problems. *Drug Alcohol Depend.* 2000;59(3):295-304.

Saraiva GL, Lazaretti-Castro M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002;46(1):72-8.

Sarkar S, Mitlak BH, Wong M, Stock JL, Black DM, Harper KD. Relationships between bone mineral density and incident vertebral fracture risk with raloxifene therapy. *J Bone Miner Res.* 2002;17(1):1-10.

Schriefer JL, Robling AG, Warden SJ, Fournier AJ, Mason JJ, Turner CH. A comparison of mechanical properties derived from multiple skeletal sites in mice. *J Biomech.* 2005;38(3):467-75.

Schuit SC, Van der Klift M, Weel AE, de Laet CE, Burger H, Seeman E, et al. Fracture incidence and association with bone mineral density in elderly men and women: the Rotterdam Study. *Bone.* 2004;34(1):195-202.

Scott DM, Taylor RE. Health-related effects of genetic variations of alcohol-metabolizing enzymes in African Americans. *Alcohol Res Health.* 2007;30(1):18-21.

Seeman E. Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatol.* 2008;47(4):iv2-8.

Segatto ML, Silva, RS, Laranjeiras R, Pinsky I. O impacto do uso de álcool em pacientes admitidos em um pronto-socorro geral universitário. *Rev Psiquiatr Clín.* 2008;35(4):138-43.

Seitz HK, Becker P. Alcohol metabolism and cancer risk alcohol. *Res Health.* 2007;30(1):38-47.

Senra GS. Avaliação da qualidade óssea no reparo de defeitos ósseos sob a ação do risedronato e da deficiência estrogênica [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2009.

Serakides R, Ocarino NM, Cardoso TGS, Moraes JRC, Nunes VA, Silva AE. Resposta da paratireóide de ratas às variações do cálcio e fósforo plasmáticos no hipertireoidismo e hipogonadismo. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2005;57(1):48-54.

Shaikh A, Berndt T, Kumar R. Regulation of phosphate homeostasis by the phosphatonins and other novel mediators. *Pediatr Nephrol.* 2008;23(8):1203–10.

Shin SM, Cho IJ, Kim SG. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMPK-mediated GSK3 β inhibition downstream of poly(ADP-ribose) polymerase-LKB1 pathway. *Mol Pharmacol.* 2009:1-36.

Shores MM, Matsumoto AM, Sloan KL, Kivlahan DR. Low serum testosterone and mortality in male veterans. *Arch Intern Med.* 2006;166(14-28):1660-5.

Silva MJ. Biomechanics of osteoporotic fractures. *Injury Int J Care.* 2007;3853(3):569-76.

Silva OB, Fuchs FD. Fármacos de uso não-médico. In: Fuchs FD, Wannmacher L, Ferreira MBC, eds. *Farmacologia Clínica. Fundamentos da Terapêutica Racional.* 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Simsek G, Uzun H, Aydin S, Karter Y, Benian A, Dariyrlı N, et al. The role of nitric oxide on bone metabolism in ovariectomized rats following chronic ethanol intake. *Life Sci.* 2005;76(17):1965-74.

Simsek G, Uzun H, Karter Y, Aydin S, Yigit G. Effects of osteoporotic cytokines in ovary-intact and ovariectomized rats with induced hyperthyroidism; is skeletal responsiveness to thyroid hormone altered in estrogen deficiency? *Tohoku J Exp Med.* 2003;201(2):81-9.

Sjögren H, Valverius P, Eriksson A. Gender differences in role of alcohol in fatal injury events. *Eur J Public Health.* 2006;16(3):266-70.

Sloan CD, Sayarath V, Moore JH. Systems genetics of alcoholism. *Alcohol Res Health.* 2008;31(1):14-25.

Snyder PJ, Peachey H, Hannoush P, Berlim JA, Loh L, Lenlow DA, et al. Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(8):2647-53.

Soares LES, Santo AME, Aldo B, Aparecida FA, Abrahão AM. Effects of Er:YAG laser irradiation and manipulation treatments on dentin components, part 2: energy-dispersive x-ray fluorescence spectrometry study. *J Biomed Optics.* 2009;14(2):24001-7.

Souza DM, Ricardo LH, Kantoski KZ, Rocha RF. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res.* 2009;23(3):326-32.

Spanagel R. Recent animal models of alcoholism. *Alcohol Res Health.* 2000;24(2):124-31.

Stránský M, Ryšavá L. Nutrition as prevention and treatment of osteoporosis. *Physiol Res.* 2009;58(1):S7-11.

Strat YL, Ramoz N, Schummann G, Gordwood. Molecular genetics of alcohol dependence and related endophenotypes. *Curr Genom.* 2008;9(7):444-51.

Sumida KD, Cogger AA, Mayveyenko AV. Alcohol-induced suppression of gluconeogenesis is greater in ethanol fed female rat hepatocytes than males. *Alcohol.* 2007;41(2):67-75.

Sunyer T, Lewis J, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Estrogen's bone-protective effects may involve differential IL-1 receptor regulation in human osteoclast-like cells. *J Clin Invest.* 1999;103(10):1409-18.

Talmage RV, Talmage DW. Calcium homeostasis: solving the solubility problem. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006;6(4):402-07.

Todd AC, Chettle DR. In vivo X-ray fluorescence of in bone: review and current issues. *Environ Health Perspect.* 1994;102(2):172-7.

Tujague J, Keer WC. Metabolic effects: energy intake estimates of respondent-measured alcoholic beverages. *Alcohol Alcohol*. 2009; 44(1):34-41.

Turner AS. Animal models of osteoporosis: necessity and limitations. *Eur Cell Mater*. 2001;1:66-81.

Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone*. 1993;14(4):595-608.

Turner CH. Aging and fragility of bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007;7(4):342-3.

Turner RT, Kidder LS, Zhang M, Harris SA, Westerlind KC, Maran A, et al. Estrogen has rapid tissue-specific effects on rat bone. *J Appl Physiol*. 1999;86(6):1950-99.

Turner RT, Sibonga JD. Effects of alcohol use and estrogen on bone. *Alcohol Res Health*. 2001;25(4):276-81.

Turner RT. Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24(11):1693–1701.

Tzaphlidou M, Speller R, Royle G, Griffiths J. Preliminary estimates of the calcium/phosphorus ratio at different cortical bone sites using synchrotron microCT. *Phys Med Biol*. 2006;51(7): 1849–55.

Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocrine Rev*. 2004;25(3):389-425.

Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Van Herck E, Swinnen JV, Bouillon R. An aged rat model of partial androgen deficiency: prevention of both loss of bone and lean body mass by low-dose androgen replacement. *Endocrinology*. 2000;141(5):1642-7.

Vasikaran SD. Utility of biochemical markers of bone turnover and bone mineral density in management of osteoporosis. *Crit Rev Cl Lab Sci*. 2008;45(2):221-58.

Veloso DFM, Petroianu A, Figueiredo JA, Rodrigues FHOC, Carneiro BGMC, Cardoso PO. Efeito da orquiectomia na capacidade física de ratos. *Einstein*. 2008;6(4):413-5.

Vieira JGH. Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43(2):75-82.

Wahl DA, Czernuszka JT. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Euro Cells Mat*. 2006;11:43-56.

Wallen WJ, Belanger MP, Wittnich C. Body weight and food intake profiles are modulated by sex hormones and tamoxifen in chronically hypertensive rats. *J Nutr*. 2002;132(8):2246-50.

Wallock-Montelius LM, Villanueva JA, Chapin RE, Conley AJ, Nguyen HP, Ames BN, et al. Chronic ethanol perturbs testicular folate metabolism and dietary folate deficiency reduces sex hormone levels in the Yucatan micropig. *Biol Reprod*. 2007;76(3):455-65.

Wang MC, Bachrach LK, Van Loan M, Hudes M, Flegal KM, Crawford PB. The relative contributions of lean tissue mass and fat mass to bone density in young women. *Bone*. 2005;37:474-81.

Wardlaw GM 1996 Putting body weight and osteoporosis into perspective. *Am J Clin Nutr* 63(3):S433–6.

Wilkin JT, Devendra D. For and against: bone densitometry is not a good predictor of hip fracture. *BMJ*. 2001;323(6):795-9.

Witson SW. Osso. In TenCate AR. *Histologia bucal: desenvolvimento estrutura e função*. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

World Health Organization. Assessment of osteoporosis at the primary health care level. Summary Report of a WHO Scientific Group. WHO, Geneva. [Acessado em 12/04/2009]. Disponível em: www.who.int/chp/topics/rheumatic/en/index.html.

World Health Organization. Collaborative Study Group on Alcohol and Injuries. Alcohol and injury in emergency departments: summary of the report from the World Health Organization; 2007.

Yang J, Kong X, Martins-Santos MES Aleman G, Chaco E, Liu GE, et al. The activation of SIRT1 by resveratrol represses transcription of the gene for the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) by deacetylating HNF4 α . JBC. 2009; 284:27042-53.

Zakhari S. Overview: how is alcohol metabolized by the body? Alcohol Res Health. 2006;29(4):245-54.

Zaleski M, Morato GS, Silva VA, Lemos T. Aspectos neurofarmacológicos do uso crônico e da síndrome de abstinência do álcool. Rev Bras Psiquiatria. 2004;26(1):40-2.

Zamburlini M, Pejovic-Milie A, Chettle DR, Webber CE, Gyorffy J. In vivo study of an x-ray fluorescence system to detect bone strontium non-invasively. Phys Med Biol. 2007;52(8):2107-22.

Zhang Y, Lai WP, Leung PC, Wu CF, Wong MS. Short-to mid-term effects of ovariectomy on bone turnover, bone mass and bone strength in rats. Biol Pharm Bull. 2007;30(5) 898-903.

Zhao LJ, Liu YJ, Liu PY, Hamilton J, Recker RR, Deng HW. Relationship of obesity with osteoporosis. J Clin Endocrinol Metab. 92(5):1640–6.

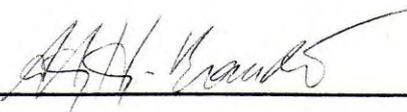
ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dimas
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028 / 9037
Fax (12) 3947-9010 / aigotti@fosjc.unesp.br / Guedes@fosjc.unesp.br

CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **037/2007-PA/CEP**, sobre **“Propriedades mecânicas e constituição iônica do fêmur de ratos com e sem deficiência hormonal tratados com álcool”** sob responsabilidade de **ROSILENE FERNANDES DA ROCHA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 08 de outubro de 2007.



Profa. Dra. ADRIANA AIGOTTI HABERBECK BRANDÃO
Coordenadora do CEP/ANIMAIS/FOSJC

Lodi KB. *Bone mineral impact in chronic alcoholism associated with hormonal depletion in rats [thesis].* São José dos Campos: São José dos Campos Dental School, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2010.

ABSTRACT

Ethanol abuse is correlated with decreased bone mass, increase of fracture risks and, should a fracture occur, may impair bone healing. Overall, fractures in alcoholics are associated with longer hospitalization and increased mortality. Up to 50% of ambulatory chronic alcoholics demonstrate evidence of bone loss. Additionally, a negative correlation between ethanol intake and bone mineral density in humans and animal models has been demonstrated. The basis for these consequent deleterious effects may occur beyond the direct actions on bone, due to hormonal disturbance and nutritional deficiencies that follow excessive ethanol intake. The aim of this study was to investigate the biomechanical effect on rat femur as well the biochemical parameters and bone mineral contents caused by hormonal deficiency and ethanol abuse. Male and female Wistar rats (n=108) were divided in male orchietomy (ORQ), female ovariectomy (OVX) or Sham-operated and subdivided by diet (ad libitum, pair-fed, ethanol 20% groups). After 1 month from surgery, they were daily fed with controlled diet for 8 weeks. Ca and P were analyzed by biochemical test in the blood and by X-ray fluorescence spectrometry of femur area. Biomechanical properties were also analyzed by 3-point bending test. These findings demonstrate that hormonal depletion promoted an increase in female body weight and loss on male. The data also revealed serum hyperphosphataemia in ethanol-ORQ and ethanol-OVX groups. Reduce on bone Ca/P molar ratio and bone Ca content in all ethanol groups. In similarity, spectrometry indicated decreased in bone P content in Sham-ad libitum groups. Biomechanical properties were affected by hormonal depletion only in male. The relationships among ethanol consume and hormonal deficit support the hypothesis that they affects synergically the body nutrition, disturb Ca and P homeostasis and may mediate important modifying in bone hydroxyapatite structure becoming an important risk factor for osteoporosis.

Keyword: Alcoholism. Bone. Hormonal depletion. Rat. X-ray spectroscopy.