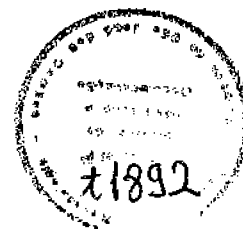


**ROSILENE FERNANDES DA ROCHA**

**INFLUÊNCIA DO CONSUMO CRÔNICO DE ÁLCOOL  
NO FÊMUR DE RATOS MACHOS E FÊMEAS**



Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,  
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a  
obtenção do Título de Livre-Docente em Farmacologia.

**São José dos Campos**

**2005**

tD12

R582i

t 1892

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:

BELLINI, A.B.; SILVA, E.A. **Manual para elaboração de monografias: estrutura do trabalho científico**. São José dos Campos: FOSJC/UNESP, 2002. 82p.

ROCHA, R.F. **Influência do consumo crônico de álcool no fêmur de ratos machos e fêmeas**. 2005. 111f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2005

*"Os vencedores da batalha da vida são os homens perseverantes que, sem se julgarem gênios se convenceram de que, só pela perseverança e esforço poderiam chegar ao fim almejado"*

Coelho Neto

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Satyro e Edith,  
Aos meus sogros, Divino e Eunice,  
Por tudo que fizeram, o meu sincero agradecimento*

*Aos meus irmãos, Edna e Edison,  
Dilcéa e Alfredo  
O meu reconhecimento do apoio  
em todos estes anos.*

*Aos meus sobrinhos  
Tatiana, Milena, Laila, Laís, Maiara e Eduardo  
e a todos os "adotados":  
muito obrigada pelo carinho e atenção!*

*Aos meus filhos Carolina, Vinicius e Alexandre,  
que com certeza, sem vocês, eu não estaria aqui,  
que com certeza são a minha "força interior"  
OBRIGADA por fazerem parte da minha vida  
Por terem me escolhido como "mãe"!*

*Ao Divanir,  
meu companheiro e amigo  
meu apoio,  
o meu muito obrigada.*

## AGRADECIMENTOS

À UNESP, na pessoa do Diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, **Prof. Dr. Paulo Vilela Santos Júnior**, pela oportunidade da realização deste concurso.

Aos Professores **Adriana Aigotti Haberbeck Brandão**, **Antonio Olavo Cardoso Jorge**, **Luiz Eduardo Blumer Rosa**, **Yasmin Rodarte Carvalho**, pelas críticas, sugestões e apoio sempre presentes, pelos momentos alegres e tristes, enfim pelo apoio que sempre recebi deste que cheguei à Patologia.

A todos os Professores do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal pelo apoio na execução deste trabalho.

Ao Prof. **Ivan Balcucci** pelas sugestões e ajuda na estatística deste trabalho.

À **Disciplina de Radiologia** pela disponibilidade na execução das tomadas radiográficas.

À Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP, nos amigos **Prof. Dr. Marcos Tadeu Tavares Pacheco**; **Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro** e **Profa. Dra. Renata Amadei Nicolau**, agradeço por ter possibilitado a utilização do IP & D - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, na utilização do Programa Leica Qwin.

À Universidade São Paulo, especialmente à Faculdade de Veterinária, na pessoa do Prof. Dr. Franklin de Almeida Stermán e de Caterina Muramoto pela ajuda na realização da medida da densidade óptica dos fêmures neste trabalho.

As secretárias da pós-graduação, **Rosemary da Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consiglio de Souza**, pela atenção e disponibilidade dispensadas em todos os momentos necessários.

À **Iara Carolina Frigi Kogiso, Ana Rita Silva Oliveira, Odete da Silva Pimentel e Sandra Mara Cordeiro** pela paciência, atenção e carinho sempre presentes em todos estes anos.

À bibliotecária **Ângela de Brito Bellini e Silvana Alvarez** pela disponibilidade e esmero na revisão desta tese

À **Sílvia Scarpel**, pelo apoio na elaboração do memorial, pelo suporte nas correções deste trabalho e pela atenção sempre dispensada no nosso dia a dia, no nosso árduo trabalho com a pós-graduação, por ser minha amiga em horas tão difíceis, o meu muito obrigada.

À Profa. **Orléia Mari Guarnieri Hofmann** pela correção gramatical deste trabalho.

Aos funcionários do biotério, **Lourival Jacobs e Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos** pela colaboração e respeito nestes anos de convívio diário.

A todos **funcionários técnico administrativos**, por quem tenho o maior respeito, pois nosso trabalho depende muito do de vocês, muito obrigada.

Aos meus **alunos da graduação**, da **pós-graduação**, em especial a Susana e Daniela pela colaboração neste trabalho, pelas minhas horas de ausência, pela paciência, muito obrigado. Com certeza, vocês são parte fundamental neste trabalho.

Aos meus **alunos de iniciação científica**, especialmente a Verônica, Daniele e Érika e aos estagiários que muito contribuíram neste trabalho, principalmente dando o suporte na minha ausência.

Aos **animais experimentais**, por quem tenho o maior carinho, cujas vidas foram sacrificadas em benefício da ciência, na busca de respostas para nossos questionamentos, agradeço o sacrifício, com a certeza de não ter sido em vão. O meu maior respeito!

A todos aqueles, companheiros de todos os dias, pelas alegrias e tristezas, àqueles que por ventura eu tenha esquecido de nominar, aqui fica o meu agradecimento de coração!

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
RESUMO.....	11
1 INTRODUÇÃO .....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Álcool.....	14
2.2 Remodelação óssea e osteoporose.....	28
2.3 Efeitos do álcool no tecido ósseo.....	44
3 PROPOSIÇÃO.....	51
4 MATERIAL E MÉTODO.....	52
4.1 Animais.....	52
4.2 Grupos experimentais.....	52
4.2.1 Esquema e denominação dos grupos experimentais.....	53
4.2.2 Sistemática de realização do experimento.....	54
4.3 Sacrifício dos animais.....	55
4.4 Alterações de peso corpóreo e condição nutricional.....	55
4.4.1 Peso corpóreo.....	55
4.4.2 Condição nutricional.....	56
4.5 Alterações morfológicas do fêmur.....	56
4.5.1 Medidas do comprimento e largura.....	56
4.5.2 Análise da espessura radiográfica da cortical óssea.....	57
4.5.3 Análise percentual de osso trabecular.....	58
4.5.4 Análise da densidade óptica.....	60
4.6 Análise estatística.....	63

5 RESULTADOS	64
5.1 Peso corporal.....	64
5.2 Condição nutricional.....	66
5.3 Alterações morfológicas do fêmur.....	70
5.3.1 Comprimento do fêmur.....	70
5.3.2 Largura méso-distal .....	73
5.3.3 Largura ântero-posterior.....	74
5.3.4 Espessura radiográfica da cortical óssea.....	76
5.3.5 Análise percentual do trabeculado ósseo.....	78
5.3.6 Análise da densidade óptica.....	82
6 DISCUSSÃO.....	85
7 CONCLUSÃO.....	96
8 REFERÊNCIAS.....	97
ANEXO.....	110
ABSTRACT.....	111

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	enzima álcool desidrogenase
ANOVA	análise de variância
AUDIT	teste de identificação de desordens devido ao uso de álcool
DEXA	absorciometria dupla de emissão de raios X
DMO	densidade mineral óssea
DO	densidade óptica
É $\alpha$	receptor $\alpha$ para estrógeno
ER $\beta$	receptor $\beta$ para estrógeno
GABA	ácido gama aminobutírico
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
NAD	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida dinucleotídeo reduzido
OMS	Organização Mundial de Saúde
QM	quadrado médio
SMOE	sistema microsomal de oxidase de função mista
SQ	soma dos quadrados
TNF $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa

**ROCHA, R. F. Influência do consumo crônico de álcool no fêmur de ratos machos e fêmeas.** 2005. 111f. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2005.

## **RESUMO**

Considerando que o álcool tem sido identificado, na literatura, como um fator de risco evidente para o desenvolvimento de osteoporose, induzindo a perda de massa óssea, propusemo-nos neste trabalho a avaliar o efeito do álcool no fêmur de ratos machos e fêmeas. Para tanto, foram utilizados 35 ratos machos e 35 fêmeas divididos em sete grupos de cinco animais por gênero. Os grupos foram: grupo controle, que receberam água e ração à vontade; grupo álcool nas concentrações de 10, 20 e 30% e o grupo isocalórico correspondente às concentrações de álcool. Após 8 semanas os animais foram sacrificados e avaliados quanto ao peso corpóreo e condição nutricional. Os fêmures unilaterais removidos e analisados, quanto ao comprimento, largura, espessura da cortical, porcentagem de trabéculas e densidade óptica. Os dados obtidos foram analisados pela ANOVA (Tukey;  $p < 0,05$ ). Quanto ao peso, houve perda de peso dos animais dos grupos álcool 20% nas fêmeas e nos machos 30%. Quanto à condição nutricional as fêmeas com as doses de 10, 20 e 30% de álcool ingeriram em média 25, 39 e 53% de Kcal/dia e os machos 22, 36 e 45 Kcal/dia provenientes do álcool. O álcool diminuiu o comprimento do fêmur somente no grupo MG6. A largura médio-distal foi maior no grupo FG6, no entanto a largura ântero-posterior não se modificou. A espessura da cortical tanto nos machos como nas fêmeas não foi alterado; no entanto a porcentagem do osso trabeculado diminuiu tanto nas fêmeas álcool 30% como nas três concentrações alcoólicas nos machos. A densidade óptica apresentou-se reduzida nas concentrações de 30% tanto nos machos como nas fêmeas. Dentre as condições experimentais concluiu-se que o efeito do álcool foi evidente nos machos e no osso trabecular, e que a concentração alcoólica de 30% foi a mais deletéria para o tecido ósseo provavelmente, levando a diminuição da massa óssea e à osteopenia

**PALAVRAS-CHAVE:** Alcoolismo; álcool; osteoporose; fêmur, osteogênese; osteoblastos; trabéculas ósseas.

## 1 INTRODUÇÃO

As bebidas alcoólicas são aquelas que contém álcool na sua composição e, embora, sejam consideradas uma droga, apresentam grande aceitação social. A permissividade ao álcool leva à falsa crença de inocência do seu uso, mas o consumo excessivo tem sido um dos grandes problemas de saúde das sociedades modernas.

Independentemente do motivo de sua ingestão, seus efeitos se fazem presentes, trazendo conseqüências por vezes bastante severas, em ambos os sexos, embora as mulheres respondam de maneira diferente dos homens.

O uso abusivo, além de estar relacionado a várias patologias afeta também os ossos, levando à osteoporose, doença de grande incidência mundial, com repercussões desastrosas não só para o próprio indivíduo que a consome, como para os que estão a sua volta.

A osteoporose, nas mulheres, tem como principal causa a deficiência estrogênica e nos homens uma das causas é o consumo de álcool; embora esta substância também apresente efeito benéfico dependendo da idade em que é ingerida

Nos países desenvolvidos observa-se redução no consumo de álcool e nos países em desenvolvimento, este consumo tem

crescido muito. Sua ingestão é responsável pela alta porcentagem das mortes violentas, além de representar 95% das substâncias tóxicas que levam as pessoas a ingressarem nos hospitais brasileiros.

Por estas razões é que este trabalho tem o objetivo de verificar e comparar o efeito do consumo crônico do álcool no fêmur de ratos machos e fêmeas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Álcool

O consumo de álcool, na forma de álcool etílico, vem se destacando entre as bebidas alcoólicas, há 8000 anos. Antigamente, essa bebida diluída era preferida à água, pois fornecia calorias e nutrientes, sendo importante fonte de dieta líquida. No entanto, com o passar dos anos, e com a purificação da água, tornou-se menos consumida (KATZUNG<sup>40</sup>, 2003).

As bebidas alcoólicas, consumidas por boa parte da população, são aquelas que, em concentrações variadas e dependendo do processo de fabricação, contém álcool etílico ou etanol em sua composição. Por meio do processo da fermentação de açúcares são obtidos a cerveja e o vinho, com cerca de 4 a 12% de etanol respectivamente, e, pelo processo de destilação são produzidas bebidas concentradas como uísque, vodca, rum, conhaque, pinga e outras, com conteúdo de etanol ao redor de 40 a 50% (FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003).

Hoje em dia, em relação a outras substâncias sedativo-hipnóticas, é a bebida mais amplamente consumida. Quando ingerida em quantidade baixa a moderada produz sensação de bem-estar e alívio da ansiedade ou até mesmo euforia. No entanto, apresenta-se

perigosa quando consumida de forma abusiva, tornando-se responsável por enormes custos médicos e sociais. Boa parte das pessoas são capazes de desfrutar os efeitos prazerosos do álcool sem permitir que o consumo se transforme num risco para a saúde (KATZUNG<sup>40</sup>, 2003).

O alcoolismo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) é uma doença severa, crônica e degenerativa, sendo de difícil tratamento, associada a violentas causas de morte. Atinge tanto homens como mulheres, apesar de mais freqüente nos homens (MENDOZA-SASSI & BÉRIA<sup>53</sup>, 2003). Pode ser entendido como toda dependência química ao álcool com aspectos biológicos e psicossociais, constituindo o abuso e a dependência grave problema de saúde pública, superado somente pelas doenças cardiovasculares e pelo câncer (PEREIRA et al.<sup>63</sup>, 2002; KATZUNG<sup>40</sup>, 2003; WHO<sup>97</sup>, 1999).

O alcoolismo é atualmente o segundo transtorno psiquiátrico mais comum nos Estados Unidos, com prevalência que oscila entre 11 e 16%. No Brasil é a terceira causa de aposentadorias por invalidez e ocupa o segundo lugar entre os transtornos mentais. Como atinge principalmente indivíduos na faixa etária dos 25 aos 55 anos implica em baixa produtividade, acidentes de trabalho e elevado absenteísmo (PEREIRA et al.<sup>63</sup>, 2002).

No Brasil o consumo de álcool é considerado alto, estando relacionado com quase 2% do total de mortes na cidade de São Paulo, principalmente mortes violentas, que obtiveram teste positivo para

alta concentração de álcool no sangue em 35 a 55% dos casos. Além disso, o álcool se destacou como substância tóxica utilizada em 95% dos casos que levaram os indivíduos a ingressar nos hospitais brasileiros (WHO<sup>97</sup>, 1999).

Segundo Nelson & Kolls<sup>58</sup> (2002), mais de três quartos das milhares de mortes ocorridas em 1990, em vários países, foram atribuídas ao álcool. De acordo com o autor, o consumo de mais de três drinques por dia está associado com o aumento da mortalidade, sendo que este índice aumenta com o aumento do consumo.

De acordo com Lima<sup>49</sup> (1998) o alcoolismo é a condição na qual o consumo por qualquer tempo e quantidade acarreta conseqüências adversas para quem bebe, para sua família e para a comunidade. O alcoolista é o indivíduo cujo consumo crônico está lhe trazendo mais repercussões negativas que positivas, sejam orgânicas, psicológicas ou sociais, independentes da quantidade ingerida. No entanto, cerca de 60 gramas de álcool/dia, ou quatro drinques-padrão/dia, por um período de seis meses seguidos gera um alcoolista.

O teste de identificação de desordens provocadas pelo abuso do álcool (AUDIT – Teste de identificação de desordens devido ao uso de álcool) é um instrumento que vem se popularizando em todo mundo (ALVES et al.<sup>2</sup>, 2003). Este teste consta de dez questões com o objetivo de identificar dependentes do álcool. As questões do formulário referem-se aos últimos 12 meses, sendo que as três primeiras medem a

quantidade e frequência do uso regular ou ocasional de álcool; as três seguintes investigam os sintomas de dependência e as quatro finais são a respeito dos problemas recentes na vida relacionados ao consumo crônico do álcool. Uma pontuação acima de oito indica a necessidade de um diagnóstico mais específico. O resultado pode ser avaliado por meio de quatro níveis de escores classificados em consumo de baixo risco ou abstinência; consumo de risco; consumo de alto risco ou uso nocivo e provável dependência (BABOR et al.<sup>4</sup>, 2001).

Mendoza-Sassi & Béria<sup>53</sup> (2003) utilizaram este teste para identificar a prevalência de potenciais problemas decorrentes do álcool em 1260 indivíduos com idade acima de 15 anos, no município do Rio Grande (RS). Os autores verificaram que a prevalência de consumo foi de 43%, envolvendo 31% de mulheres e 56% de homens. Observaram ainda que a incidência de potenciais distúrbios associados ao álcool foi de 7,9% envolvendo 14,5% de homens e 2,4% de mulheres.

Os limites de uso do álcool são definidos pela "dose padrão", que difere entre os países, variando de 8<sup>←</sup>gramas de etanol absoluto no Reino Unido a 19,75 gramas no Japão. No Brasil, 15 gramas de etanol correspondem a uma dose padrão e deve ser relacionada com as bebidas alcoólicas de consumo comum. Como exemplo, temos que uma dose para a cerveja (5%) é de 350 ml, para o vinho (11 a 13%) é em torno de 140 ml, para o vinho do porto (25%) ou licor é de 70 ml e para os destilados como pinga, vodka, rum, uísque e conhaque (40%) em torno

de 40 ml (LIMA<sup>49</sup>, 1998; ALVES et al.<sup>2</sup>, 2003). Segundo Dufour<sup>23</sup>(2001) e Lieber<sup>48</sup>(2003) um drinque foi definido como 12 oz (onças) de cerveja, 5 oz de vinho ou 1,5 oz de bebida destilada, correspondendo a 12 a 14 gramas de etanol.

O limite máximo de consumo de baixo risco para homens é de 20 gramas de álcool por dia (duas doses) em no máximo cinco dias da semana; na mulher e idosos estes se reduzem à metade. Geralmente as mulheres, por possuírem menor quantidade de água corporal que os homens, atingem maior alcoolemia com a mesma quantidade ingerida, sendo que o consumo não deve ultrapassar uma dose álcool por dia (ALVES et al.<sup>2</sup>, 2003).

De acordo com o sexo, bebedores moderados do sexo feminino com idade inferior a 65 anos podem tomar menos que um drinque por dia e os homens dois drinques por dia e para os bebedores moderados com mais de 65 anos, tanto para homens como para as mulheres a dose é de um drinque por dia (BRIENZA & STEIN<sup>14</sup>, 2002).

Devido à alta disponibilidade das bebidas alcoólicas, do hábito de beber ser extremamente comum, socialmente aceito e estimulado, torna-se difícil discriminar bebedores normais de bebedores problema (LIMA<sup>49</sup>, 1998). Segundo Bobo<sup>11</sup> (2002), os indicadores da aquisição de dependência são compulsão por beber; controle prejudicado (inabilidade de parar de beber uma vez que se inicia); alívio quando se bebe (como forma de evitar a síndrome de abstinência); aumento da

tolerância (necessitando ingerir maior quantidade para alcançar o efeito desejado) e a síndrome de abstinência.

O etanol, molécula hidrossolúvel, após sua ingestão, inicia a absorção pela mucosa bucal e pelos alvéolos pulmonares em quantidades insignificantes. Em seguida, 20% é absorvido no estômago e o restante, pelo processo de difusão simples, no epitélio intestinal. No intestino delgado, principalmente no duodeno e jejuno, ocorre o momento mais importante da absorção, sendo que a presença de alimento retarda a absorção e diminui a velocidade de esvaziamento gástrico. Posteriormente, a distribuição é rápida e os níveis teciduais aproximam-se da concentração sangüínea. Verifica-se que, após a ingestão de álcool em jejum, as concentrações sangüíneas são alcançadas em 30 minutos (LIMA<sup>49</sup>, 1998; PEREIRA et al.<sup>63</sup>, 2002; FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003; KATZUNG<sup>40</sup>, 2003).

Depois de passar pelo trato gastrintestinal, alcança a circulação sistêmica e pela sua solubilidade distribui-se pela massa magra do corpo (cérebro, músculos, fígado), marcando a diferença que existe entre os efeitos do álcool quanto ao sexo, já que o volume de distribuição é menor nas mulheres que nos homens. É fato também que as mulheres possuem mais gordura e menor massa corpórea magra que os homens, levando a concentrações sangüíneas mais elevadas que nos homens para a mesma quantidade ingerida (LIMA<sup>49</sup>, 1998; BRIENZA & STEIN<sup>14</sup>, 2002; PEREIRA et al.<sup>63</sup>, 2002).

De acordo com a literatura, a concentração alcoólica que chega ao sangue depende da quantidade consumida em determinado tempo, da massa corporal, do metabolismo e da quantidade de alimento no estômago. Após a absorção, mais de 90% é metabolizado no fígado e pequena porção eliminada *in natura* pelos pulmões e rins, sendo, no entanto, essa pequena quantidade consistente e utilizada nos testes com bafômetros. O metabolismo do álcool à acetaldeído envolve a via da enzima álcool desidrogenase (LIEBER<sup>47</sup>, 2000) e o sistema microsomal de oxidase de função mista (KATZUNG<sup>40</sup>, 2003; FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003; LIEBER<sup>48</sup>, 2003; RANG et al.<sup>67</sup>, 2004).

A via da enzima álcool desidrogenase (ADH), que catalisa o álcool em acetaldeído, ocorre principalmente no fígado, cérebro e estômago. Por esta via, a molécula de etanol é convertida em acetaldeído pela ação da enzima ADH, em reação que utiliza o nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD) como receptor de hidrogênio, produzindo assim o nicotinamida-dinucleotídeo reduzido (NADH). O acetaldeído é então convertido no fígado em acetato pela ação da aldeído-desidrogenase. O acetaldeído, produto tóxico do etanol, é o responsável pelo rubor e perda de calor devido a vasodilatação dos capilares cutâneos (PEREIRA et al.<sup>63</sup>, 2002; FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003; KATZUNG<sup>40</sup>, 2003) contribuindo também para a hepatotoxicidade (RANG et al.<sup>67</sup>, 2004), hiperlipidemia,

hipoglicemia, esteatose, gastrite (LIEBER<sup>47, 48</sup>, 2000 e 2003) e câncer (McKILLOP & SCHRUM<sup>52</sup>, 2005).

Pela via do sistema microsomal de oxidase de função mista (SMOE), reação que envolve o citocromo P450, quantidade insignificante é metabolizada. A indução deste sistema ocorre em alcoolistas quando é consumida grande quantidade de etanol e o sistema da ADH está saturado. Este tipo de metabolismo ocorre nos microsomos, ricos em enzimas responsáveis pelo metabolismo oxidativo das substâncias (KATZUNG<sup>40</sup>, 2003), levando ao aumento da degradação das vitaminas e diminuição da oxidação de ácidos graxos (LIEBER<sup>47, 48</sup> 2000 e 2003).

A oxidação do etanol ocorre em velocidade constante e independente das suas concentrações séricas. Em média, um indivíduo adulto oxida cerca de 10 ml de álcool por hora, o que corresponde a 7,9 gramas, sendo a maior parte oxidada e apenas 2 a 10% eliminado na forma inalterada (FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003).

O organismo converte 1,0 grama de álcool em 7,1 Kcal/g e nada mais é aproveitado. A importância deste fornecimento calórico está no fato de que a ingestão de álcool pode significar em termos nutricionais. Em alcoolistas, é comum que 40 a 60% das calorias diárias derivem do álcool; no entanto, essas calorias são vazias, isto é, não estão relacionadas à proteínas, sais minerais ou vitaminas, levando à deficiências nutricionais sérias pela baixa

ingestão de nutrientes (LIEBER<sup>47</sup>, 2000), com alterações na farmacocinética levando à toxicidade do etanol (SILVA<sup>81</sup>, 2000). Essa deficiência ocorre, embora as bebidas alcoólicas contenham em sua composição, além do álcool propriamente dito, água e variável quantidade de açúcares como carboidratos e outros nutrientes como proteínas, vitaminas ou minerais. No entanto esses nutrientes não apresentam nenhum valor biológico, por terem dificuldade do processo de absorção (LIEBER<sup>48</sup>, 2003).

O metabolismo de 70 gramas ou mais de álcool (correspondente a seis copos de cerveja) impõe grande sobrecarga ao fígado resultando em diminuição da gliconeogênese causando hipoglicemia, cetoacidose, devido ao aumento da relação NADH/NAD em decorrência da oxidação do etanol (KATZUNG<sup>40</sup>, 2003).

Os leigos, geralmente, consideram as bebidas alcoólicas como estimulantes, porém o álcool é um depressor do sistema nervoso central. A ingestão de quantidades moderadas produz ações ansiolíticas e desinibição comportamental. Os sinais de intoxicação variam de manifestações expansivas do afeto até alterações descontroladas do humor e crises emocionais, podendo apresentar até reações de violência, anestesia geral e efeitos letais (FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003).

Apesar do álcool ser consumido especialmente por sua ação estimulante, esta é aparente e ocorre apenas com doses

moderadas. Este efeito é resultante da depressão dos mecanismos controladores inibitórios principalmente sobre o córtex, levando a pensamentos desorganizados e confusos, bem como interrupção da operação adequada do controle motor (PEREIRA et al.<sup>63</sup>, 2002).

Os efeitos agudos do álcool sobre o sistema nervoso central são proporcionais à alcoolemia. Concentrações próximas de 50 mg/dl apresentam efeito ansiolítico e levemente euforizante. Com 50 mg/dl aparecem sinais de embriaguez moderada e a partir de 250 mg/dl observa-se embriaguez importante como ataxia e incoordenação motora, voz pastosa, humor lábil e emotividade incontrolável. Podem ocorrer também alterações mnêmicas, comportamento inadequado e aparecimento de náuseas e vômitos devido à irritação gástrica. Acima de 350 mg/dl leva ao coma, sendo a dose de 500 mg/dl letal (PEREIRA et al.<sup>63</sup>, 2002; KATZUNG<sup>40</sup>, 2003).

No sistema nervoso central, o álcool tem ação preponderante em canais iônicos, ligando-se ao receptor do ácido gama aminobutírico (GABA), abrindo os canais de cloro, promovendo potencial pós-sináptico inibitório (BITTENCOURT<sup>8</sup>, 2000), ocasionando relaxamento e sedação (CARDOSO et al.<sup>17</sup>, 2005). No receptor do glutamato, fundamental na memória e cognição, o NMDA (n-metil-d-aspartato), voltagem dependente, associado a canais de íons permeáveis ao cálcio, sódio e potássio, eleva a concentração de

cálcio induzindo degeneração dos neurônios e morte neuronal (FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003).

O álcool interage também com o receptor da dopamina, importante neurotransmissor relacionado à coordenação dos movimentos, aumentando assim a atividade motora (BITTENCOURT<sup>8</sup>, 2000).

Em doses agudas, o álcool provoca depressão significativa da contratilidade cardíaca. No entanto, o consumo maciço está associado à miocardiopatia dilatada com hipertrofia e fibrose ventricular, provavelmente por ruptura da membrana celular da fibra miocárdica, redução da função das mitocôndrias e do retículo endoplasmático, acúmulo de fosfolípidos e ácidos graxos (KATZUNG<sup>40</sup>, 2003) podendo elevar a pressão arterial (FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003).

No sistema gastrointestinal produz refluxo gastroesofágico, ruptura do esôfago, câncer e outras alterações. No estômago, o uso intenso pode induzir gastrite aguda e crônica, por estimulações das secreções gástricas, promovendo a liberação de gastrina e histamina, além do efeito direto na mucosa gástrica (LIEBER<sup>47</sup>, 2000; FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003).

Diarréia crônica pode ser observada em alcoólatras devido a síndrome de má absorção no intestino delgado, com

episódios de fezes amolecidas, fissuras retais e prurido anal. Pancreatite aguda e crônica é uma das alterações mais comuns em indivíduos que fazem uso intenso do álcool provavelmente pelo efeito tóxico direto nos ácinos (FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003) além de provocar anorexia (SANTOLARIA et al.<sup>79</sup>, 2000).

O álcool, no fígado, induz alterações como infiltração gordurosa, hepatite e cirrose (FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003). A esteatose hepática, acúmulo de gordura, é acompanhado pela ativação das células de Kupffer, que quando ativados, liberam mediadores como citocinas, e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), levando a produção de radicais livres, que por sua vez, provocam mais danos hepáticos (WHEELER<sup>92</sup>, 2003). Histologicamente uma característica bastante comum dessas lesões hepáticas é a presença de corpúsculos de Mallory, inclusões hialinas, que variam de acordo com a gravidade da doença (DENK et al.<sup>21</sup>, 2000).

Indivíduos que consomem grandes quantidades de bebidas alcoólicas apresentam deficiências nutricionais, quer por diminuição da ingestão ou da absorção, quer por comprometimento da utilização de nutrientes. Especificamente a deficiência protéica e da vitamina C podem induzir alterações na síntese de colágeno prejudicando o processo de cicatrização tecidual (LIEBER<sup>47,48</sup>, 2000 e 2003).

O consumo crônico de álcool poderá alterar as funções fisiológicas como o mecanismo de defesa levando a conseqüências graves, dentre elas o aumento na incidência de certas formas de câncer (LONGNECKER & TSENG<sup>50</sup>, 1998), principalmente o carcinoma hepatocelular (McKILLOP & SCHRUM<sup>52</sup>, 2005). Após a metabolização do etanol, com o acúmulo de acetaldeído e sobrecarga de radicais livres, ocorre lesão do DNA celular. O uso abusivo do álcool induz também a enzima citocromo P450 a produzir mais radicais livres, prejudicando ainda mais as funções celulares (McKILLOP & SCHRUM<sup>52</sup>, 2005). Ocorre diminuição da quimiotaxia dos granulócitos, decréscimo da resposta dos linfócitos à mitógenos, diminuição no número de células T e na atividade das células natural killer (KATZUNG<sup>40</sup>, 2003) levando a supressão da resposta imune (MESSINGHAM et al.<sup>54</sup>, 2002; NELSON & KOLLS<sup>58</sup>, 2002).

O álcool, embora aparentemente melhore o ato sexual, apresenta efeito oposto. Inicialmente exerce efeito excitatório levando ao aumento da libido. Entretanto, o consumo excessivo leva a diminuição da excitação sexual, aumento da latência ejaculatória, redução do prazer, provocando impotência em até 50% dos pacientes (FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003).

Em gestantes, o abuso crônico leva à síndrome alcoólica fetal (BOBO<sup>11</sup>, 2000), com efeitos teratogênicos importantes como retardo mental, anomalias craniofaciais, microcefalias, fissuras

palpebrais, fenda palatina, hipoplasia de maxilares e estrabismo, podendo ocorrer também distúrbios da função motora, anormalidades cardíacas e genitais entre outras malformações congênitas (SILVA<sup>81</sup>, 2000; LAWSON<sup>44</sup>, 2002).

Colantoni et al.<sup>18</sup> (2000) investigaram a influência dos hormônios sexuais na indução de lesões no fígado de ratos machos e fêmeas consumidores de álcool a 35% por oito semanas. Os autores evidenciaram maior quantidade de injúrias severas nas fêmeas e atribuíram como responsável por essas diferenças, a presença do estrógeno, pois ele reduz significativamente a taxa de metabolismo e eliminação do etanol e a atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH).

Gonzalez-Calvin et al.<sup>31</sup> (1993) estudaram pacientes sem cirrose, agrupados em etilistas pesados, moderados e não etilistas e concluíram que a ingestão crônica de álcool induz à osteopenia mesmo na ausência de doença hepática, e que existe correlação entre a quantidade e a duração da ingestão e o grau de perda óssea. O baixo nível de proteína óssea, em bebedores, são reversíveis com a retirada do etanol, sugerindo que a redução da atividade osteoblástica é provavelmente a principal responsável pela doença óssea associada ao álcool.

Os efeitos precisos do álcool no esqueleto ainda não estão bem estabelecidos pela dificuldade em se distinguir o efeito do

etanol no metabolismo associado a outros fatores (TURNER<sup>86</sup>, 2000). Entretanto, diversos trabalhos têm utilizado animais de laboratório para verificar os efeitos do álcool sobre o tecido ósseo (SAMPSON & SHIPLEY<sup>76</sup>, 1997; HOGAN et al.<sup>36, 37</sup>, 1997 e 2001; SAMPSON<sup>74</sup>, 1998; DYER et al.<sup>23</sup>, 1998; PENG et al.<sup>61</sup>, 1988; SAMPSON & SPEARS<sup>77</sup>, 1999; TURNER<sup>86</sup>, 2000; WEZEMAN & GONG<sup>93</sup>, 2001; NYQUIST et al.<sup>59</sup>, 2002; REED et al.<sup>68</sup>, 2002; ELMALI et al.<sup>26</sup>, 2002; WEZEMAN et al.<sup>94</sup>, 2003; HEFFERAN et al.<sup>35</sup>, 2003; CALLACI et al.<sup>16</sup>, 2004).

## **2.2 Remodelação óssea e osteoporose**

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo, complexo e dinâmico, que tem como funções suporte, proteção, participação nos movimentos, homeostasia mineral, produção de células sangüíneas e armazenamento de triglicerídeos (TORTORA & GRABOWSKI<sup>85</sup>, 2002).

É um tecido mineralizado, cujo peso consiste em 33% de matriz orgânica, sendo 28% de colágeno tipo I e 5% de proteínas não colagenosas como osteonectina, osteocalcina, proteína morfogenética óssea, proteoglicanas ósseas e sialoproteínas ósseas. A matriz orgânica é permeada por cristais de hidroxiapatita

( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) que perfazem os 67% remanescentes do osso (TEN CATE<sup>83</sup>, 2001).

Os ossos apresentam uma densa camada externa de osso cortical compacto e uma cavidade medular central, que é preenchida por medula óssea vermelha ou amarela. A cavidade medular é interrompida particularmente nas extremidades dos ossos longos, por uma malha trabecular óssea, o osso esponjoso (TEN CATE<sup>83</sup>, 2001).

O tecido ósseo é formado por células e material extracelular calcificado, a matriz óssea. As células são os osteócitos, que situam-se em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, produtores de parte orgânica da matriz e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem o tecido ósseo, participando dos processos de remodelação. Os ossos são revestidos em suas superfícies externa e interna por membranas conjuntivas que contêm células osteogênicas, o perióstio e o endóstio, que apresentam como função principal a nutrição e fornecimento de novos osteoblastos para o crescimento e a renovação do osso (JUNQUEIRA & CARNEIRO<sup>38</sup>, 2004).

O esqueleto é constituído de 80% de osso cortical e 20% de trabecular. O cortical consiste na parte externa, densa e compacta predominando nas diáfises dos ossos longos. O trabecular, em forma de rede, é encontrado nas vértebras, nas epífises dos ossos

longos e na crista íliaca, sendo metabolicamente mais ativo e afetado por vários fatores (RANG et al.<sup>67</sup>, 2004).

O processo de remodelação óssea ocorre continuamente por toda a vida do indivíduo, o que é essencial para a manutenção da estrutura óssea saudável (TURNER<sup>86</sup>, 2000). A remodelação envolve tanto a formação quanto a reabsorção, interferindo no grau de mineralização do tecido ósseo (GUEDES JÚNIOR et al.<sup>32</sup>, 2003; LANGER<sup>43</sup>, 2004; RANG et al.<sup>37</sup>, 2004).

As células responsáveis por este fenômeno são os osteoblastos, que depositam matriz óssea, e os osteoclastos, que a degradam, formando a unidade multicelular básica. O osteoblasto é considerado o agente promotor, controlando também a diferenciação dos osteoclastos durante o contato intercelular (MUNDY<sup>56</sup>, 1999; BOYLE et al.<sup>12</sup>, 2003; HARADA & RODAN<sup>34</sup>, 2003; JUNQUEIRA & CARNEIRO<sup>38</sup>, 2004; RANG et al.<sup>67</sup>, 2004).

Os osteoclastos exercem sua atividade aderindo-se à matriz óssea mineralizada, a ser reabsorvida, formando uma zona chamada de compartimento de reabsorção óssea, na qual ocorre adesão bem organizada, envolvendo a interação entre moléculas da membrana celular e proteínas da matriz óssea, delimitada por um anel de membrana plasmática (BOYLE et al.<sup>12</sup>, 2003; GUEDES JÚNIOR et al.<sup>32</sup>, 2003; LANGER<sup>43</sup>, 2004). Nesse compartimento, enzimas proteolíticas produzidas pelos osteoclastos são secretadas e digerem

a matriz. Ocorre assim a diminuição do pH pelo bombeamento ativo de prótons e formação da borda em escova, modificando a membrana plasmática na porção da célula em contato direto com a área de reabsorção com a finalidade de aumentar a área ativa da celular de contato. Além de secretar hidrogênio para o meio, o osteoclasto produz ácido lático e hialurônico, reduzindo o pH local e aumentando o poder de dissolução das fibras colágenas (MUNDY<sup>56</sup>, 1999; LANGER<sup>43</sup>, 2004). Após a reabsorção do tecido ósseo, o osteoclasto se solta, move-se ao longo da superfície óssea até encontrar novo sítio de adesão e formar assim nova região de reabsorção (GUEDES JÚNIOR et al.<sup>32</sup>, 2003).

Para que todo este processo ocorra, há liberação de fatores de crescimento insulínico e fator de crescimento transformante beta (RANG et al.<sup>67</sup>, 2004). Estes fatores ativam os osteoblastos que migram para esta região em número de cem a cento e cinquenta constituindo assim a frente de formação e mineralização óssea. Nesse local ocorre um equilíbrio de íons, permitindo que os osteoblastos iniciem a síntese e deposição de matriz (LANGER<sup>43</sup>, 2004). Inicialmente é depositado um tecido ósseo primário que posteriormente torna-se maduro. A quantidade de formação óssea é proporcional ao número de osteoblastos presentes na área, e quanto maior o tempo de vida destas células maior a formação óssea local (DUCY et al.<sup>22</sup>, 2000).

O controle da remodelação óssea em diferentes locais é explicado pela existência de mecanismos autócrinos e/ou parácrinos, além de controle sistêmico pelo sistema endócrino, no entanto, ao longo da vida, nos ciclos de remodelação óssea ocorrem falhas levando à perda óssea (DUCY et al.<sup>22</sup>, 2000).

Diversos estímulos como dieta deficiente, hiperparatireoidismo, hipervitaminose, altas doses de corticosteróides, deficiência estrogênica e consumo de etanol podem aumentar a reabsorção pelos osteoclastos (BAE & STEIN<sup>5</sup>, 2004; RANG et al.<sup>67</sup>, 2004).

A velocidade de remodelação óssea varia dependendo do tipo de osso. Trinta por cento do trabecular renova-se anualmente em relação a três por cento do cortical no mesmo período. Este fato é importante, pois mostra a maior suscetibilidade do osso trabecular aos fatores que interferem na remodelação óssea (RANG et al.<sup>67</sup>, 2004).

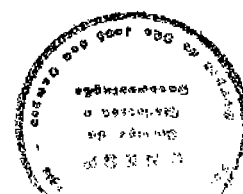
A osteoporose é uma doença óssea sistêmica, progressiva, caracterizada pela baixa massa óssea e deteriorização da microarquitetura do tecido ósseo, com conseqüente aumento da fragilidade e suscetibilidade à fratura, especialmente no quadril, fêmur, corpos vertebrais e antebraço, embora possa acometer qualquer osso (BLAKE & FOGELMAN<sup>10</sup>, 2002; CALERO et al.<sup>15</sup>, 2000; NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION<sup>57</sup>, 2004; WATTS<sup>91</sup>, 2004).

Esta alteração patológica é considerada um grave problema de saúde pública, afetando as mulheres, principalmente no período pós-menopausa, e mais recentemente reconhecida como de grande impacto nos homens (GUEDES JÚNIOR et al.<sup>32</sup>, 2003; NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION<sup>57</sup>, 2004; WATTS<sup>91</sup>, 2004; VONDRACEK & HANSEN<sup>90</sup>, 2004; GILBERT & McKIERNAN<sup>30</sup>, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (1994), a osteoporose é definida pela densidade mineral óssea (DMO) expressa em escores. Quando a perda da DMO apresenta-se igual ou menor que 2,5 desvios padrão abaixo da média de um adulto jovem considera-se como osteoporose. Já nos indivíduos osteopênicos, forma menos severa de perda óssea, o desvio padrão encontra-se entre 1 e 2,5 desvios padrão abaixo da média (LEDFORD et al.<sup>46</sup>, 1998; BLAKE & FOGELMAN<sup>10</sup>, 2002; FUKS<sup>29</sup>, 2004; WATTS<sup>91</sup>, 2004; GILBERT & McKIERNAN<sup>30</sup>, 2005; WHO<sup>96</sup>, 1994).

A osteoporose é uma doença silenciosa, pois ocorre de maneira assintomática, já que indivíduos acometidos geralmente só têm diagnóstico confirmado após algum tipo de fratura. Uma em cada duas mulheres e um entre quatro homens com idade superior a 50 anos apresentarão uma fratura no decorrer da vida relacionado à osteoporose. Ao ano ocorrem mais de setecentas mil fraturas vertebrais, sendo trezentas mil no quadril, duzentos e cinquenta mil no pulso e trezentas mil em outras localidades (GUEDES JÚNIOR<sup>32</sup>,

T 1892



2003; NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION<sup>57</sup>, 2004; WATTS<sup>91</sup>, 2004).

Segundo os dados da OMS estima-se que existam mais de dez milhões de pessoas com osteoporose nos EUA e mais dezoito milhões com baixa massa óssea. Pode-se prever, através de estimativas, que no ano de 2015, esses valores aumentem para quinze e vinte e sete milhões de indivíduos atingidos, respectivamente (SZEJNFELD<sup>82</sup>, 2000), sendo para 2050 a perspectiva do número de fraturas de quadril de três a quatro maior (FUJIWARA<sup>28</sup>, 2005).

A OMS reconhece que a osteoporose é o segundo maior problema de saúde pública depois das doenças do coração limitando a qualidade de vida da mulher. No Brasil, foi demonstrado que 13,3% das mulheres brasileiras (cerca de dois milhões) com idade de 45 anos apresentam fragilidade óssea, podendo evoluir para fraturas. Foi realizado alerta quanto a medidas preventivas e terapêuticas, informando e esclarecendo os indivíduos a respeito dos fatores de risco e das armas para combater tal doença (MARQUES NETO<sup>51</sup>, 2005, WHO<sup>96</sup>, 1994).

A osteoporose pode ser classificada em primária ou secundária. A primária está relacionada ao envelhecimento e ao período após a menopausa (BANDEIRA et al.<sup>7</sup>, 2000; VONDRACEK & HANSEN<sup>90</sup>, 2004). As formas secundárias caracterizam-se por ser a

manifestação de um processo patológico claramente identificado (ORLIC & RAIZ<sup>60</sup>, 1998).

A primária é subdividida em tipo I e tipo II. A do tipo I inclui a osteoporose pós-menopausa e acarreta rápida perda óssea na mulher, atingindo predominantemente o osso trabecular, estando associada à fratura das vértebras e do rádio. A tipo II ou senil está relacionada ao envelhecimento correndo por deficiência crônica de cálcio e diminuição da formação óssea (BANDEIRA et al.<sup>7</sup>, 2000; SZEJNFELD<sup>82</sup>, 2000).

Uma das causas da osteoporose nas mulheres está relacionada à deficiência estrogênica, como a que ocorre pós-menopausa, sendo esta, portanto, grande fator de risco para seu desenvolvimento (MODESTO FILHO et al<sup>55</sup>, 1996; BRANDÃO & HAUACHE<sup>13</sup>, 2005).

O estrógeno é um hormônio que tem influência no crescimento, diferenciação e função de muitos tecidos, principalmente do sistema reprodutor, tanto feminino quanto masculino, além de apresentar importante papel sobre o tecido ósseo (RUGGIERO & LIKIS<sup>71</sup>, 2002). É produzido principalmente no ovário e periféricamente pela conversão do colesterol em androstenediona, que pela ação da enzima aromatase é convertida em 17 $\beta$ -estradiol (estradiol), encontrada em maior quantidade, estrona e estriol. O estrógeno é altamente lipossolúvel e difunde-se rapidamente pelas membranas,

liga-se ao receptor citoplasmático e ao chegar ao núcleo liga-se ao DNA da célula iniciando a síntese de proteínas, tendo seu efeito nos órgãos alvo (RANG et al.<sup>67</sup>, 2004).

Existem dois tipos de receptores para o estrógeno, o ER $\alpha$  e o ER $\beta$ , com distribuições diferentes nos tecidos. O ER $\alpha$  está presente no útero, fígado, glândulas mamárias, rim, testículo. Já o ER $\beta$  é encontrado no cérebro, pulmão, trato urinário, sistema vascular, osso e no sistema reprodutor. O ovário, útero, mama, sistema cardiovascular e cérebro apresentam os dois tipos de receptores (RUGGIERO & LIKIS<sup>71</sup>, 2002; TIVISTEN et al.<sup>84</sup>, 2004). O ER $\alpha$  é predominante no osso cortical e o ER $\beta$  no osso trabecular (RIGGS et al.<sup>69</sup>, 2002). Segundo Leder et al.<sup>45</sup> (2003) nos osteoblastos além de expressos receptores para estrógeno, também são expressos receptores para andrógenos.

A deficiência de estrógeno parece estar também relacionada à produção aumentada de citocinas, como a IL-1 e IL-6, que provocam aumento do número de osteoclastos (MODESTO FILHO et al.<sup>55</sup>, 1996) e da reabsorção óssea (TURNER & SIBONGA<sup>87</sup>, 2001), além de regular a atividade da aromatase nos osteoblastos (RIGGS et al.<sup>69</sup>, 2002).

A osteoporose secundária é decorrente de diversas condições sistêmicas como alterações endócrinas (aumento da

atividade do paratormônio, hipertireoidismo e desordens adrenais), mieloma múltiplo, falta de atividade física, processos inflamatórios como artrite, uso de substâncias como heparina, álcool, vitamina A e corticosteróides (EASTELL et al.<sup>25</sup>, 1998; ORLIC & RAISZ<sup>60</sup>, 1998; LEDFORD et al.<sup>46</sup>, 1998; RIGGS et al.<sup>69</sup>, 2002; LANGER<sup>43</sup>, 2004; VONDRACEK & HANSEN<sup>90</sup>, 2004; WATTS<sup>91</sup>, 2004) além do consumo de tabaco (SAMPSON<sup>75</sup>, 2002; WILLIAMS et al.<sup>95</sup>, 2005).

Estudos epidemiológicos em humanos indicam que o uso moderado de álcool (WILLIAMS et al.<sup>95</sup>, 2005) pode estar associado com a diminuição do risco de fraturas nas mulheres na pós-menopausa. (SAMPSON<sup>73</sup>, 1998). As mulheres com 65 anos de idade ou mais que consomem álcool por mais de cinco dias na semana tem reduzido risco de apresentar deformidade vertebral comparada com as que consomem menos de uma dose por semana (SAMPSON<sup>75</sup>, 2002), Segundo Longnecker & Tseng<sup>50</sup> (1998), doses de 42 a 45 gramas de álcool, o equivalente a três drinques e meio a quatro drinques padrão, causam aumento temporário nos níveis de estradiol em mulheres pós-menopausa que fazem terapia de reposição hormonal.

O consumo crônico de álcool, particularmente durante a adolescência e no adulto jovem, reduz o pico de massa óssea, ficando o osso mais frágil e mais suscetível à fratura (SAMPSON<sup>73</sup>, 1998; SAMPSON<sup>75</sup>, 2002).

A osteoporose masculina pode ser classificada como primária, (relacionada com a idade ou idiopática) ou secundária. A primária tende a ocorrer em homens com mais de setenta anos e pode ter relação com a diminuição da absorção de cálcio, redução da atividade da vitamina D, declínio da função dos osteoblastos e diminuição da concentração dos hormônios sexuais (VONDRACEK & HANSEN<sup>90</sup>, 2004; KAMEL<sup>39</sup>, 2005).

Na secundária, as causas mais freqüentes são o hipogonadismo, doenças crônicas, tratamento com medicamentos, abuso do álcool e estilo de vida (COMPSTON<sup>19</sup>, 2001; PYE et al.<sup>65</sup>, 2003; VONDRACEK & HANSEN<sup>90</sup>, 2004; BLAIN<sup>9</sup>, 2004; KAMEL<sup>39</sup>, 2005).

A incidência da osteoporose secundária é maior na população masculina, correspondendo a 64% dos casos de osteopenia em homens, enquanto atinge apenas 30% nas mulheres, sendo a causa mais freqüente em ambos os casos o uso de glicocorticóides (BRANDÃO & HAUACHE<sup>13</sup>, 2005). Na osteoporose masculina, as fraturas de quadril e coluna, são comuns e bastante debilitantes e por vezes fatais (SEEMAN<sup>80</sup>, 1995).

Como já descrito, a deficiência estrogênica é uma das causas responsáveis pela osteoporose nas mulheres; no entanto, os andrógenos, como a testosterona também regula diretamente as células osteoblásticas incluindo sua proliferação, diferenciação e

capacidade de mineralização (PREVELIC<sup>64</sup>, 2001; RIGGS et al.<sup>69</sup>, 2002). De acordo com Tivesten et al.<sup>84</sup> (2004), o tratamento de animais com estrógeno e testosterona apresenta papel protetor no osso trabecular em animais ovariectomizados. Segundo Ammann et al.<sup>3</sup> (1999), substâncias seletivas para receptores de estrógeno administradas a ratas ovariectomizadas aumentam a densidade mineral óssea.

A testosterona, principal andrógeno natural, é sintetizado pelas células do testículo e em menores quantidades pelo ovário e pela córtex da supra renal. Sua síntese ocorre a partir do colesterol em androstenediona que por sua vez é convertida em testosterona. Esta através da 5 $\alpha$ redutase é convertida em diidrotestosterona e pela aromatase em estradiol. A androstenediona através da enzima aromatase é convertida em estrona. A testosterona aumenta a vida dos osteoblastos e osteoclastos sem afetar a apoptose e assim contribui para a formação óssea (RANG et al.<sup>67</sup>, 2004).

Trabalhos mostram que homens submetidos a tratamentos que induzem a diminuição dos hormônios masculinos desenvolvem osteoporose (BAE & STEIN<sup>5</sup>, 2004; NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION<sup>57</sup>, 2004) e tem sido demonstrado que homens com nível baixo de testosterona têm indicação de reposição com a finalidade de tratar esta doença (LANGER<sup>43</sup>, 2004).

A terapêutica de reposição com testosterona em homens com hipogonadismo, apresenta resposta variável na densidade mineral óssea (PREVELIC<sup>64</sup>, 2001; RIGGS et al.<sup>69</sup>, 2002). Outras substâncias, como bifosfonatos (BLAIN<sup>9</sup>, 2004) e teriparatida também apresentam efeitos benéficos no tratamento da osteoporose (KAMEL<sup>39</sup>, 2005).

A massa óssea aumenta gradativamente a partir do nascimento, durante a infância e adolescência, atingindo seu pico ao redor dos vinte e cinco anos na mulher e trinta a trinta e cinco anos no homem. O pico da massa óssea pode ser influenciado por fatores genéticos, raciais, nutricionais como cálcio e proteínas; endócrinos; forças mecânicas como atividade física e peso corporal e exposição aos fatores de risco (RIZZOLI & BONJOUR<sup>70</sup>, 1999).

Após esse período ocorre a parada do crescimento ósseo, porém o processo de remodelação é constante. Com o avançar da idade a formação torna-se menor que a reabsorção (GUEDES JÚNIOR et al.<sup>32</sup>, 2003; FUKS<sup>29</sup>, 2004; LANGER<sup>43</sup>, 2004), levando com o tempo ao desenvolvimento da osteopenia senil (TURNER & SIBONGA<sup>87</sup>, 2001).

O decréscimo da massa óssea tem início por volta dos trinta a quarenta anos, ocorrendo de forma contínua, lenta e linear, sendo mais proeminente no osso cortical que no trabecular (COMPSTON<sup>20</sup>, 2001; RADOMINSKI et al.<sup>66</sup>, 2002). No início, os

ossos trabeculares, corpos vertebrais dorsais e lombares e região distal do rádio são as regiões mais afetadas. O osso cortical, como colo do fêmur e a cunha das vértebras, são os que levam mais tempo para serem afetados (CALERO et al.<sup>15</sup>, 2000; GUEDES JÚNIOR, et al.<sup>32</sup>, 2003, FUKS<sup>29</sup>, 2004) e com o passar do tempo aumenta o risco de fraturas (BLAKE & FOGELMAN<sup>10</sup>, 2002).

A perda da massa óssea ocorre da mesma maneira para homens e mulheres até o período da menopausa, quando estas apresentam uma perda severa, atingindo valores ao redor de 2% ao ano, com duração de cinco a dez anos, em função do remodelamento ósseo, provavelmente devido à deficiência estrogênica (GUEDES JÚNIOR et al.<sup>32</sup>, 2003; VONDRACEK & HANSEN<sup>90</sup>, 2004).

O estrógeno age de maneira importante na manutenção da massa óssea em mulheres adultas por diminuir a remodelação óssea. (TURNER & SIBONGA<sup>87</sup>, 2001). Segundo Rang et al.<sup>67</sup> (2004), os estrógenos têm papel fundamental na manutenção da integridade óssea; inibem citocinas, que recrutam os osteoclastos, opondo-se à ação de reabsorção óssea.

Segundo Compston<sup>20</sup> (2001), o estrógeno é essencial na fase do platô do crescimento ósseo em ambos os sexos, embora a resistência ao estrógeno e a deficiência da enzima aromatase no homem estejam associadas com atraso na idade.

Várias são as formas para diagnosticar e avaliar a massa óssea em casos de osteopenia, osteoporose ou outras doenças ósseas, por meio de exames de urina e sangue, pelos marcadores de formação e reabsorção óssea (BANDEIRA<sup>7</sup>, 2000; SZEJNFELD<sup>82</sup>, 2000; HANNON & EASTELL<sup>33</sup>, 2000). No sangue e urina podem ser avaliados hormônios, cálcio, fosfato, fosfatase alcalina para quantificar a remodelação óssea, no entanto, os valores obtidos não refletem as perdas recentes (VONDRACEK & HANSEN<sup>90</sup>, 2004; WATTS<sup>91</sup>, 2004). Podemos quantificar a atividade osteoblástica no sangue por meio da fosfatase alcalina, osteocalcina e pelo telopeptídeo C-terminal do colágeno I. Na urina, como marcador da atividade osteoclástica, temos a hidroxiprolina e o telopeptídeo N-terminal do colágeno tipo I (BANDEIRA<sup>7</sup>, 2000; SZEJNFELD<sup>82</sup>, 2000; FUKS<sup>29</sup>, 2004).

Exames de imagens também são empregados para quantificar a densidade óssea trabecular e cortical em todo esqueleto, como as radiografias, densitometria óssea, ultra-som e tomografias (BLAKE & FOGELMAN<sup>10</sup>, 2002; CALERO et al.<sup>15</sup>, 2000; GUEDES JÚNIOR et al.<sup>32</sup>, 2003; BAE & STEIN<sup>5</sup>, 2004; FUKS<sup>29</sup>, 2004).

A radiografia convencional é de fácil execução, porém não é considerada a mais adequada, pois só teremos imagens compatíveis com rarefação óssea quando a perda mineral estiver ao redor de 30 a 50% (CALERO et al.<sup>15</sup>, 2000; GUEDES JÚNIOR et al.<sup>32</sup>,

2003; BRANDÃO & HAUACHE<sup>13</sup>, 2005); no entanto, é bastante eficiente para quantificar osso cortical (BAE & STEIN<sup>5</sup>, 2004).

O ultra-som pode ser realizado para avaliar a densidade mineral óssea e o paciente não é submetido à radiação. Esta técnica não é tão precisa quanto a densitometria, sendo indicada apenas como exame complementar (CALERO et al.<sup>15</sup>, 2000; GUEDES JUNIOR et al.<sup>32</sup>, 2003; BAE & STEIN<sup>5</sup>, 2004).

A densitometria óssea é atualmente a técnica mais adequada para quantificar a massa óssea, sendo o paciente submetido a baixa radiação. Por meio da absorciometria dupla de emissão de raios X (DEXA), mede-se a quantidade óssea total, tanto do osso trabecular quanto do cortical (FUKS<sup>29</sup>, 2004; LANGER<sup>43</sup>, 2004; VONDRACEK & HANSEN<sup>90</sup>, 2004; BAE & STEIN<sup>5</sup>, 2004; BRANDÃO & HAUACHE<sup>13</sup>, 2005). Esta técnica utiliza dois raios X, que são atenuados diferentemente pelo osso e tecido mole. O DEXA da coluna lombar e dos fêmures proximais é considerado como método padrão ouro para o diagnóstico da osteoporose, para a avaliação do risco de fraturas e para o acompanhamento desta doença (BAE & STEIN<sup>5</sup>, 2004; BRANDÃO & HAUACHE<sup>13</sup>, 2005).

A tomografia computadorizada avalia a densidade óssea isolando o osso trabecular do cortical. Como o trabecular tem maior remodelação que o cortical este exame é considerado mais

sensível que o DEXA, no entanto, o paciente é submetido a maior radiação (BAE & STEIN<sup>5</sup>, 2004).

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

O álcool atua no metabolismo ósseo por ação direta e indireta. A ação direta é devido ao efeito antiproliferativo que gera nos osteoblastos (GONZALEZ-CALVIN et al.<sup>31</sup>, 1993; KLEIN<sup>42</sup>, 1997; DYER et al.<sup>23</sup>, 1998; BALZAN et al.<sup>6</sup>, 2001) e a indireta, principalmente, pela modulação de hormônios envolvidos no metabolismo ósseo (SAMPSON<sup>72</sup>, 1997; TURNER<sup>86</sup>, 2000; BALZAN et al.<sup>6</sup>, 2001), desenvolvimento de doenças hepáticas e desnutrição (LIEBER<sup>47</sup>, 2000)

O álcool tem sido identificado como fator de risco no desenvolvimento da osteoporose, pois seu uso crônico diminui a massa óssea e aumenta a incidência de fraturas. Segundo Kimble<sup>41</sup> (1997), o álcool tem potencial para alterar o metabolismo ósseo indiretamente por meio dos hormônios gonadais e pela secreção de citocinas, que são fatores críticos na osteoporose pós-menopausa. Dados sugerem que a deficiência de estrógeno eleva as taxas de IL-1 e TNF- $\alpha$  que tem papel direto na perda óssea. Além disso, estudos

mostram que essas citocinas são também produzidas pelo fígado danificado pela ação do álcool.

A duração do uso do álcool está associada positivamente com a severidade da osteopenia/osteoporose, sugerindo que a perda óssea é um processo gradual (HOGAN et al.<sup>37</sup>, 2001).

Estudos, em humanos etilistas, demonstram através de marcadores de formação e reabsorção, que o álcool tem papel direto nos osteoblastos, diminuindo a formação óssea e aumentando a reabsorção. (Peppersack et al.<sup>62</sup>, 1992). Outros trabalhos mostram que o consumo de quantidades excessivas de álcool durante a fase da adolescência e no indivíduo adulto jovem, compromete a saúde óssea e aumenta o risco para o desenvolvimento de osteoporose anos depois. No entanto, o consumo moderado de álcool por adultos, acima de 65 anos, apresenta efeito protetor sobre o osso (SAMPSON<sup>75</sup>, 2002).

Efeitos semelhantes aos que ocorrem nos humanos são observados em animais de laboratório, como os ratos, os quais possuem equivalência em relação à idade (SAMPSON<sup>75</sup>, 2002). Assim, trabalhos para avaliação da ação do álcool sobre o tecido ósseo são realizados em ratos, com grande aceitação no meio científico (SZEJNFELD<sup>82</sup>, 2000; HOGAN et al.<sup>37</sup>, 2001; SAMPSON<sup>75</sup>, 2002).

Numerosos estudos (PENG et al.<sup>61</sup>, 1988; HOGAN et al.<sup>36</sup>, 1997; 2001; SAMPSON & SHIPLEY<sup>76</sup>, 1997; SAMPSON<sup>78</sup>, 1997; SAMPSON<sup>74</sup>, 1998; DYER et al.<sup>23</sup>, 1998; SAMPSON & SPEARS<sup>77</sup>, 1999; WEZEMAN & GONG<sup>93</sup>, 2001; TURNER et al.<sup>88</sup>, 2001; TURNER et al.<sup>89</sup>, 2001; NYQUIST et al.<sup>59</sup>, 2002; REED et al.<sup>68</sup>, 2002; ELMALI et al.<sup>26</sup>, 2002; HEFFERAN et al.<sup>35</sup>, 2003, WEZEMAN et al.<sup>94</sup>, 2003; CALLACI et al.<sup>16</sup>, 2004) possibilitaram a demonstração da ação do álcool sobre o tecido ósseo. Foram analisados parâmetros como comprimento do osso, espessura da cortical, diâmetro da cortical, volume de osso trabecular e cortical, resistência do osso e dureza, densidade óptica, através de avaliação histomorfométrica e propriedades mecânicas. Também foram estudados marcadores de formação e reabsorção óssea através de análises bioquímicas. Um resumo destes dados pode ser verificado no Quadro 1.

Essa breve revisão da literatura deixa claro que o consumo crônico de álcool trás deletérias conseqüências para o organismo, muitas delas de grande gravidade podendo levar inclusive à morte; além de que, o alcoolismo pelos efeitos sistêmicos, diretos ou indiretos, criar uma condição dramática afetando o indivíduo e a comunidade.

Quadro 1 – Estudos que avaliam a influência do álcool em animais sobre o tecido ósseo (continua)

Autores e ano da publicação	Sexo e idade	[ ] álcool Tempo administração	Estrutura e tipo de análise	Resultados	Conclusões
PENG et al. <sup>61</sup> , 1988	M e F	8% 4 e 6 semanas	Fêmur - microscopia eletrônica - teste força	- osso trabecular invadiu diáfise fêmur - espessura cortical mais fina (4ª e 6ª semana) - resistência óssea menor com álcool - força grupo fêmeas era menor	- álcool produz mudanças estruturais fêmur com alteração ppdd. mecânicas e particularmente a força
HOGAN et al. <sup>36</sup> , 1997	F 4 meses	35%(Lieber) 2, 4, 6 e 8 semanas.	- histomorfometria - propriedades mecânicas	↓ área osso cortical ↓ formação óssea ↓ aposição mineral ↓ dureza, força	- álcool leva a uma pobre qualidade do tecido ósseo
SAMPSON & SHIPLEY, 1997	F OVX	0,38g/kg (2 doses vinho/dia) – 6 semanas	- fêmur - morfometria - densidade	OVX - ↑ peso ↓ densidade ↓ volume ↓ área ↓ número trabéculas - separação entre trabéculas	- álcool não tem efeito benéfico na administração. diária
SAMPSON et al. <sup>78</sup> , 1997	F 3 meses	35% (Lieber) 2,4,6 ou 8 semanas	Tíbia - histomorfometria	↓ volume osso ↓ número trabéculas - taxa formação emineralização não alterou	- álcool tem efeito negativo no desenvolvimento do osso, talvez devido à restrição calórica
SAMPSON, <sup>74</sup> 1998	F 4 meses	35% (Lieber) 3,6,12,18 meses	Tíbia - histomorfometria	↓ volume osso ↓ número trabéculas - não mudou espessura	- álcool reduz a atividade dos osteoblastos

Quadro 1 – Estudos que avaliam a influência do álcool em animais sobre o tecido ósseo (continua)

Autores e ano da publicação	Sexo e idade	[ ] álcool Tempo administração	Estrutura e tipo de análise	Resultados	Conclusões
DYER et al. <sup>23</sup> , 1998	F 3 meses	35% (Lieber) 6 semanas	- tibia histomorfometria nível osteocalcina	↓ volume trabecular -- 63% ↓ número trabéculas, sem significância ↓ espessura trabéculas- 50% - ↓ osteocalcina –  - ↓ número e atividade osteoblastos	↓ volume, trabéculas e espessura implica inibição da proliferação dos osteoblastos ↓ espessura trabéculas- mede a atividade os osteoblastos ↑ osteocalcina – diminuição atividade osteoblastos
SAMPSON & SPEARS <sup>77</sup> , 1999	F 4 meses	35% 2 e 4 semanas	Fêmur e tibia morfometria	fêmur: ↓ comprimento e ↓ diâmetro ↓ volume e ↓ densidade Restrição calórica - ↓ volume Tíbia : ↓ volume	- perda óssea não é recuperada - aparente melhora devido ao contínuo desenvolvimento osso jovem - ação direta células ósseas
HOGAN et al. <sup>37</sup> , 2001	F 9 meses	35% (Lieber) 8 e 14 semanas	Fêmur morfometria Ppdd mecânica	- peso menor grupo álcool sem significância - restrição calórica ↓ diâmetro ↓ volume fêmur – 14 sem. ↓ número trabéculas e espessura ↓ massa óssea - ppdd mecânica 81% menor com 14 sem. - peso, densidade e força não alterou	- consumo álcool leva a diminuição ppdds osso trabecular confirmada pela ↓ número e espessura das trabéculas, e que o efeito depende da duração do tratamento
WEZEMAN & GONG <sup>93</sup> , 2001	M e F 1 mês	36% (Lieber) 64 dias	Fêmur morfometria Análise triglicérido insulina, IGF-1, Testosterona, estradiol, progesterona	↓ peso corporal de M e F - nível triglicérido ↑ M e F insulina ↓ F IGF-1- ↓ F e ↓ M Testosterona- não alterou; Estradiol - ↑ M Progesterona - ↓ F; Leptina - ↑ M ↓ espessura cortical M e F; ↑ Diâmetro medular	Aumento triglicerídeos , leptina leva a reserva de andrógenos e estrógeno com papel importante na osteogênese

Quadro 1 – Estudos que avaliam a influência do álcool em ratos machos e fêmeas sobre o tecido ósseo (continua)

Autores e ano da publicação	Animal, e Sexo e idade	[ ] álcool Tempo administração	Estrutura e tipo de análise	Resultados	Conclusões
TURNER et al. <sup>66</sup> , 2001	F 8 meses	3, 6, 13, 35% (Lieber) 16 semanas	- tíbia - morfometria osso trabecular - número osteoclastos	- maior concentração álcool - ↓ consumo comida - consumo álcool - ↓ peso uterino - ↓ perímetro mineral e formação óssea - ↓ dose dependente área total osso trabecular, da espessura e número trabéculas, taxa formação - todas doses álcool - ↓ perímetro osteoclastos	- efeito inibitório álcool formação óssea foi dose dependente - álcool inibe proliferação osteoblasto - Álcool induz perda óssea por reduzir espessura trabecular, por distúrbio da remodelação óssea
TURNER et al. <sup>69</sup> , 2001	F 6 meses	35% (Lieber) PTH	- tíbia - morfometria - dosagem colágeno, osteocalcina e osteonectina	- não alterou peso animal e útero - com 1 semana: tendência a diminuição - com 2 semanas: álcool diminui: - ↓ formação óssea, taxa formação, - álcool não modificou efeito PTH que aumentou as taxas - ↓ espessura trabéculas - 1 semana - ↓ colágeno, osteonectina e osteocalcina	- efeito inibitório etanol na formação óssea pode ser revertido pelo PTH - álcool induz perda óssea devido a redução da formação - PTH pode ser útil no tratamento da osteoporose induzida pelo álcool
REED et al. <sup>68</sup> , 2002	M 6 meses	35% (Lieber) 16 semanas	efeito exercício Tíbia Comprimento histomorfometria	- não mudou peso - ↓ formação osso periosteal e taxa aposição com álcool - ↓ área cortical grupo álcool - exercício – não mudou medida osso cortical - ↓ volume osso com álcool - ↓ taxa formação trabeculado com álcool	- abuso álcool potencializa risco da remodelação óssea e redução da massa óssea

Quadro 1 – Estudos que avaliam a influência do álcool em animais sobre o tecido ósseo (conclusão)

Autores e ano da publicação	Sexo e idade	[ ] álcool Tempo administração	Estrutura e tipo de análise	Resultados	Conclusões
ELMALI et al. <sup>26</sup> , 2002	M	7,2% 8 semanas	Tíbia – fratura Densitometria (DEXA)	- não alterou peso - ↓ densidade mineral - ↓ conteúdo mineral	- álcool interfere no processo de reparo de fratura, associado com ↓ densidade e conteúdo mineral
NYQUIST et al. <sup>59</sup> , 2002	M 2 meses e 10 dias	15% 6 semanas	Fêmur - densidade (DEXA) - peso - compr	- ↓ peso animal - compr. Não mudou - ↓ densidade mineral e ↓ conteúdo mineral - ↓ cálcio - ppdes mecânicas não alterou	- álcool tem impacto negativo no conteúdo mineral, efeito direto no osso aumento risco fraturas
WEZEMAN et al. <sup>94</sup> , 2003	M e F 1 mês	36% (Lieber) 4 sem.	Vértebra lombar Densidade mineral osso trabecular e cortical	- peso animais M e F diminui - peso vértebra menor grupo com álcool ↓ densidade mineral osso trabecular e cortical para M e F - densidade mineral do cortical >trabecular	- álcool durante desenvolvimento reduz osteogênese levando à osteopenia
CALLACI et al. <sup>16</sup> , 2004	M 1 mês	Álcool ip 20% 1, 2 e 3 sem	Fêmur Densidade mineral Análise trabecular	- peso animais não variou ↓ densidade mineral osso trabecular (34%) - fêmur ↓ volume e área, ↑ separação trabéculas ↑ Deoxipiridinolina (3ª semana)- marcador reabsorção	- ação estimulante sobre a reabsorção levando à perda óssea

[ ] – concentração; F- (sexo feminino), M (sexo masculino); OVX- animais ovariectomizados; PTH – paratormônio, ↓ (diminuição); ↑ (aumento); ppdds (propriedades)

### **3 PROPOSIÇÃO**

Este trabalho se propõe a avaliar e comparar o efeito do consumo crônico de várias concentrações de álcool etílico no fêmur de ratos machos e fêmeas, como possível causa secundária de osteoporose.

## **MATERIAL E MÉTODO**

### **4.1 Animais**

Para este trabalho foram utilizados setenta ratos, sendo 35 machos e 35 fêmeas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*) com quatro meses de idade. As fêmeas pesavam em torno de 250 gramas e os machos de 450 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP e mantidos em gaiolas em temperatura ambiente, alimentados com dieta sólida e líquida controladas, dependendo do grupo experimental.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP sob protocolo de nº 018/2004 – PA/CEP (ANEXO A) e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **4.2 Grupos experimentais**

Os animais foram divididos em três grupos conforme o tipo de dieta administrada. Os grupos álcool e isocalórico foram divididos em seis subgrupos, sendo três de fêmeas e três de machos.

O grupo controle foi dividido em dois subgrupos conforme o gênero dos animais. O número de animais por subgrupo foi de cinco.

#### 4.2.1 Esquema e denominação dos grupos experimentais (Figura 1):

- Grupo álcool: dieta líquida contendo 10, 20 ou 30% de álcool,
- Grupo controle nutricional isocalórico – dieta líquida contendo sacarose e ração com as mesmas calorias médias ingeridas na véspera pelo grupo álcool,
- Grupo controle normal – dieta líquida contendo água e ração à vontade.

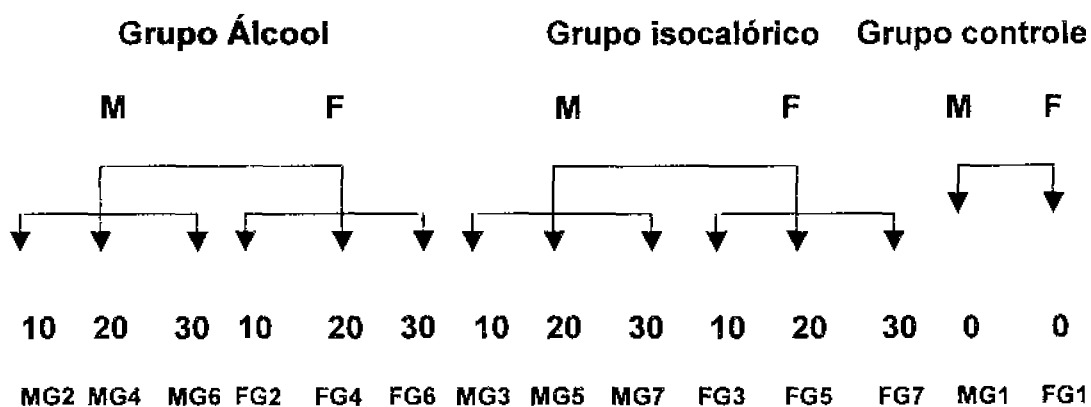


FIGURA 1 – Esquema demonstrativo dos grupos experimentais

#### 4.2.2 Sistemática de realização do experimento

A dieta sólida empregada para todos os grupos foi a ração Nutrilabor (Guabi, Campinas-SP). Para o grupo álcool foi fornecido 50 gramas de ração diariamente por animal. No dia seguinte as porções restantes foram pesadas, e obtida a quantidade média de ração ingerida, que foram fornecidas para os animais do grupo isocalórico. O grupo controle recebeu dieta sólida livre, sendo registradas as quantidades médias consumidas.

Os animais do grupo álcool receberam álcool etílico ABS.ACS-99,5° (Ecibra, Santo Amaro, São Paulo). Inicialmente, passaram por período de adaptação, que variou conforme a concentração de álcool, sendo de sete dias a 5% para os grupos FG2 e MG2; 12 dias (quatro dias a 5%, quatro dias a 10% e quatro dias a 15%) nos grupos FG4 e MG4; e 20 dias (quatro dias a 5%, quatro dias a 10%, quatro dias a 15%, quatro dias a 20% e quatro dias a 25%) nos grupos FG6 e MG6. Posteriormente, foram administradas, por oito semanas, soluções preparadas diariamente nas concentrações alcoólicas de 10, 20 e 30% conforme grupo experimental.

O grupo álcool iniciou um dia antes do grupo isocalórico, quando foi fornecido 50 ml de solução alcoólica por animal. No dia seguinte a solução restante foi medida, sendo registrada a média ingerida. Então, solução de sacarose P.A. (Vetec Química Fina LTDA,

Rio de Janeiro) com as mesmas calorias da solução alcoólica foram preparadas diariamente e fornecidas aos grupos isocalóricos correspondentes.

### **4.3 Sacrifício dos animais**

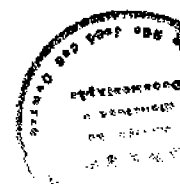
Transcorridas oito semanas do início da administração das dietas, todos os animais foram anestesiados com mistura de 13 mg/kg de cloridrato de xilasina (Rompun- Bayer – São Paulo, SP, Brasil), substância sedativa, analgésica e relaxante muscular; com 33 mg/kg de ketamina base (Dopalen – Agribrands – Jacareí, SP, Brasil), anestésico geral, por via intramuscular.

Após anestesia os animais foram sacrificados, os fêmures direito e esquerdo removidos, dissecados e fixados em formol a 10% ou em glutaraldeído 0,5%, conforme as avaliações a serem realizadas.

### **4.4 Alterações de peso corpóreo e condição nutricional**

#### **4.4.1 Peso corpóreo**

No início do experimento e imediatamente antes do sacrifício todos os animais foram pesados em balança semi-analítica



(Micronal B600) com a finalidade de verificar se o tratamento interferiu no desenvolvimento dos mesmos.

#### 4.4.2 Condição nutricional

Diariamente foram registrados os valores médios da ração e dieta líquida consumida por gaiola. A partir desses dados foram calculadas médias de consumo por animal para 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.

### 4.5 Alterações morfológicas do fêmur

#### 4.5.1 Medidas do comprimento e largura

Nos fêmures direitos dissecados foram realizadas mensurações com relação ao comprimento, de uma extremidade à outra, e largura méso-distal e ântero-posterior a uma distância padrão de ambas as extremidades. As mensurações foram obtidas com auxílio de paquímetro digital (Starrett 727- 6/150, Brasil) (Figura 2).



FIGURA 2 - Medidas do comprimento e largura do fêmur com auxílio do paquímetro.

#### 4.5.2 Análise da espessura radiográfica da cortical óssea

Os fêmures direitos foram radiografados pelo Sistema de Imagem Digital Visualix® (Gendex, Dentsply, Internacional, USA), que emprega Dispositivos de Carga Acoplada (sensor-CCD) para captura direta da imagem. As tomadas radiográficas foram realizadas utilizando aparelho de raios X digital Gendex 765DC® (65 kv e 7 mA) com tempo de exposição de 0,2 s. O sensor CCD foi fixado em uma mesa, o cilindro posicionado com distância focal de 40cm, e as peças posicionadas sobre o centro do sensor, com uma visão coronal incluindo epífise inferior.

As imagens radiográficas foram medidas três vezes, pelo mesmo examinador, por meio do programa Image Tool v. 3.0

(UTHSCSA). Para tanto, a medida intra-cortical é subtraída da extra-cortical, obtendo-se a espessura da cortical (Figura 3).

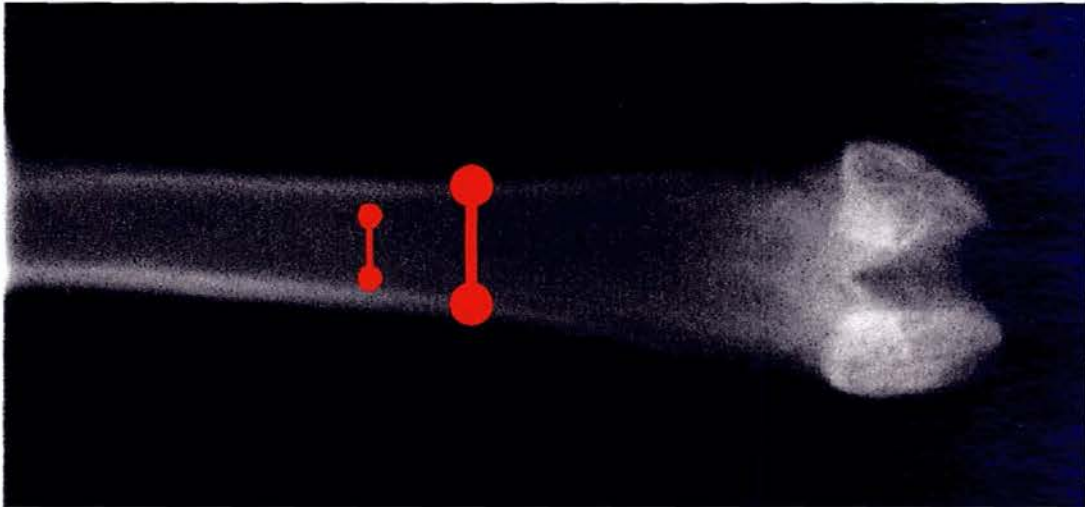


FIGURA 3 - Medida da espessura radiográfica da cortical do fêmur.

#### 4.5.3 Análise percentual de osso trabecular

Para esta análise o fêmur esquerdo, totalmente livre de tecidos moles, foi fixado em solução de glutaraldeído a 0,5%. Transcorridas 48 horas, os ossos foram cortados por meio de cortadeira (LAB CUT 1010 – EXTEC ERIOS, International Ltda) com disco diamantado em local padronizado, correspondente à região metafisária. Em seguida os ossos foram secos em estufa a 37°C por 12 horas, e metalizados com pó de ouro no aparelho Denton Vacuum Desk II, e encaminhados para observação em aparelho de microscopia eletrônica de varredura (JSM- 5600 LV–JEOL).

As imagens obtidas foram submetidas à análise histométrica por meio do programa Leica Qwin (*Quantitative Imaging Solution*, Leica Microsystems), a fim de quantificar a porcentagem de trabéculas ósseas. Para tanto, selecionou-se um retângulo com área de  $323 \times 73 \text{mm}^2$ , sempre posicionado com sua base imediatamente acima do osso cortical (Figura 4). As medidas referentes ao percentual de área trabecular presente no retângulo foram realizadas por um examinador em dois momentos distintos, considerando-se a média dos valores obtidos.

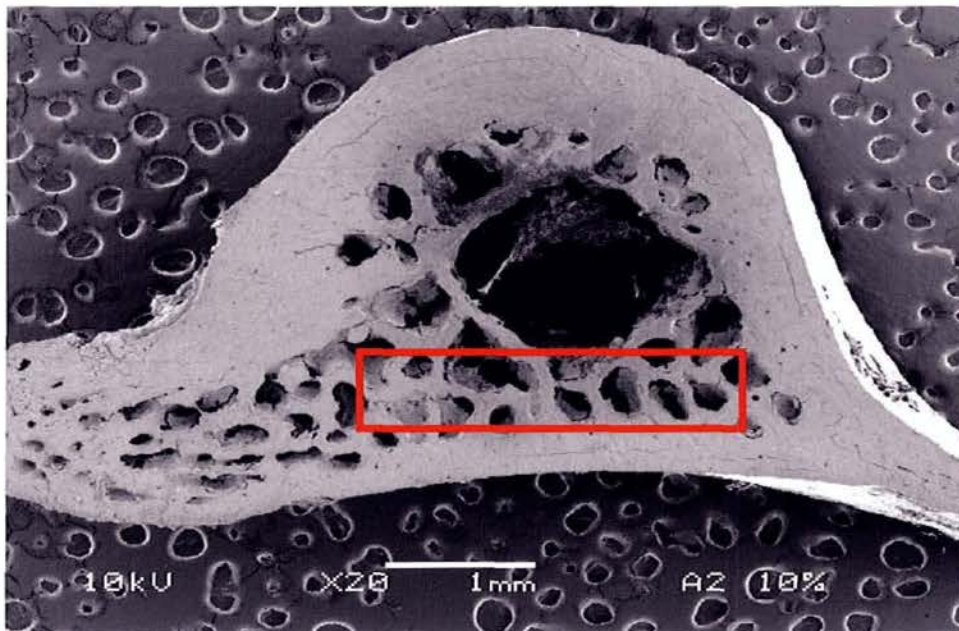


FIGURA 4 - Imagem do corte do fêmur com o quadrilátero correspondente à área de medida para análise do osso trabecular.

#### 4.5.4 Análise da densidade óptica

As radiografias dos fêmures foram feitas com chassi metálico marca Kodak Lanex equipado com tela intensificadora "regular screens" e filme marca Kodak MXG/Plus de 18x24cm, em aparelho de raio X de marca Ray tec, modelo RT 500/125, com ampola Toshiba Rotanode Tm Fluray unit model E 7239 X.

As tomadas radiográficas foram obtidas com: quilovoltagem de 40Kv, miliamperagem de 100mA, tempo de exposição de 0,016s e a distância entre o foco e o filme de 1 metro.

Para análise das imagens radiográficas obtidas foi desenvolvida uma escala de referência densitométrica em alumínio, com 20 degraus crescentes de 0,5 cm em 0,5 cm, iniciando com 0,5 mm de altura e finalizando com 1cm. A área de cada degrau é de 1,8 X 0,5 cm.

Em primeiro lugar foi feita a radiografia da escala de alumínio, que foi denominada de escala padrão, e depois de escaneada foi armazenada em computador, como referência para comparação posterior com a imagem da mesma escala de alumínio, radiografada simultaneamente aos fêmures, cuja densidade seria medida.

Os fêmures de dois grupos foram radiografados simultaneamente com a escala de alumínio, que foi posicionada no meio dos grupos perpendicularmente ao longo eixo dos ossos (Figura 5).

Após terem sido reveladas em processadora automática (RP – X OMAT, Kodak Eastman Company), as radiografias foram escaneadas no modo BMP (bitmap) e armazenadas em CD.

Nas imagens radiográficas foram realizadas três leituras pelo mesmo examinador, na região diafisária, das densidades ópticas (DO) referentes à densidade mineral óssea (DMO) em milímetros de alumínio (mmAl) por meio do programa ImageLab (Softium Sistema de Informática Ltda-SP).

O tamanho da área a ser selecionada foi determinada por um quadrilátero com os dois lados paralelos correspondendo a largura do fêmur e com a altura correspondendo à metade do comprimento de largura estabelecido (Figura 6).

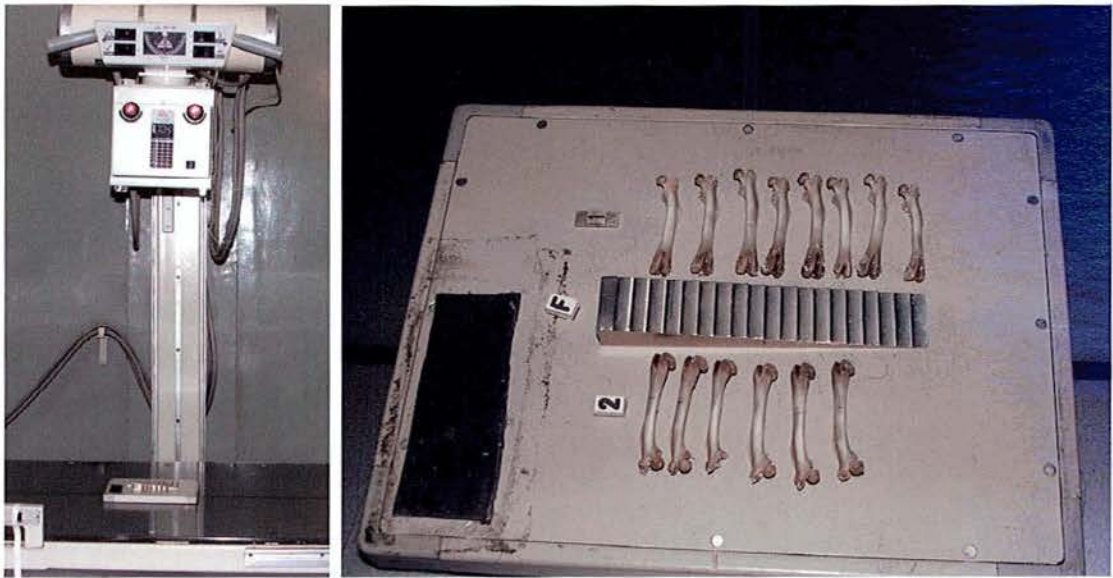


FIGURA 5 - Aparelho radiográfico (esquerda) e filme radiográfico com escala de alumínio e os fêmures dispostos (direita).

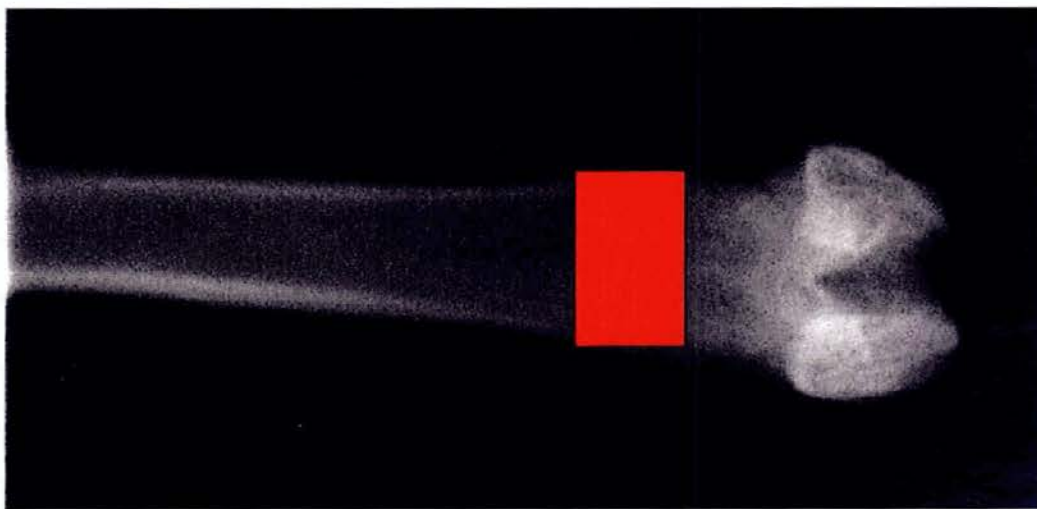
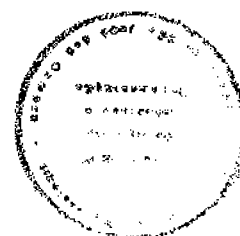


FIGURA 6 - Representação da região diafisária para medida da densidade óptica.

#### 4.6 Análise estatística

O peso dos animais foi analisado intragrupo (inicial e final) por meio do teste t pareado ( $\alpha=0.05$ ). A condição nutricional foi analisada descritivamente, considerando os dados referentes à quantidade ingerida de ração, solução líquida, dieta total e percentual correspondente à dieta líquida e sólida.

A resposta do álcool ou do correspondente isocalórico sobre o tecido ósseo nas várias medidas foi analisada intergrupo mediante a aplicação do teste de Dunnet e ANOVA (Tukey), ambos com nível de significância de 5%.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 Peso corporal

Os dados para peso corpóreo obtidos para as ratas fêmeas indicaram diferenças significantes entre as médias de peso inicial e final nos grupos FG3, FG4 e FG5. Entretanto, enquanto no grupo FG3 houve ganho de peso (6,40%), no grupo FG4 e FG5 houve perda (-3,25% e -3,88%, respectivamente). Nos grupos FG1, FG2, FG6 e FG7 não houveram diferenças nos pesos entre os períodos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias e desvio-padrão dos pesos das ratas fêmeas (gramas).

GRUPO	peso inicial (PI)	peso final (PF)	p*	% alteração peso
FG1	279.00 ± 21.62	283.00 ± 21.10	0.2942	1,49
FG2	269.40 ± 14.72	282.00 ± 20.80	0.0942	4,67
FG3	253.00 ± 16.43	269.00 ± 18.17	0.0400*	6,40
FG4	279.00 ± 12.45	270.00 ± 15.81	0.0533*	-3,25
FG5	278.00 ± 17.89	267.00 ± 15.65	0.0513*	-3,88
FG6	268.16 ± 16.67	265.35 ± 20.12	0.9162	-1,07
FG7	288.44 ± 11.26	290.88 ± 09.67	0.3634	0,88

\* teste t pareado; significância estatística para  $p < ou = 0,05$ .

Os dados para peso corpóreo obtidos para os ratos machos indicaram diferenças significantes entre as médias de peso inicial e final nos grupos MG1, MG5, MG6 e MG7. Entretanto, enquanto nos grupos MG1 e MG5 houve ganho de peso (9,45% e 11,12% respectivamente), no grupo MG6 e MG7 houve perda (-15,75% e -13,10% respectivamente). Nos grupos MG2, MG3, e MG4 não houve diferença estatística nos pesos corpóreos entre os períodos ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2- Médias e desvio-padrão dos pesos (gramas) dos ratos machos

GRUPO	peso inicial (PI)	peso final (PF)	p*	% alteração peso
MG1	473,92 ± 35,64	518.19 ± 34.15	0.0018	9,45
MG2	455,59 ± 10,38	483,47 ± 31,01	0.0823	6,10
MG3	479,14 ± 30,53	488,83 ± 30,20	0.1604	2,05
MG4	477,35 ± 42.99	488.15 ± 28.84	0.1904	2,51
MG5	438.37 ± 44.09	485.98 ± 36.03	0.0010	11,12
MG6	472,61 ± 41.59	396.88 ± 24.65	0.0049	-15,75
MG7	480,82 ± 50.35	414.39 ± 13.80	0.0379	- 13,10

\* teste t pareado; significância estatística para  $p < 0,05$ .

## 5.2 Condição nutricional

No que se refere à questão nutricional, analisados os dados obtidos diariamente nas fêmeas, verificou-se que a solução alcoólica ingerida pelos grupos FG2 e FG4 foram similares (20,05 e 17,53 ml respectivamente), apresentando-se bastante aumentada em FG6 (34,02 ml) (Tabela 3). Em relação à quantidade de calorias ingeridas por cada rata foi observado que em FG1 o consumo médio foi de 45,47kcal/d, todas provenientes da dieta sólida representada pela ração. Em FG2 e de seu grupo isocalórico FG3 o consumo médio por animal foi de 45,03 kcal/d, sendo 11,23 kcal/d, ou seja, 25%, provenientes da dieta líquida (solução alcoólica/solução de sacarose). As ratas de FG4 e de seu grupo isocalórico FG5 consumiram um total médio de 50,68 kcal/d; sendo 19,63 kcal/d oriundas da dieta líquida o que corresponde a 39,3% da energia total recebida. E, em contraste, as ratas de FG6 e FG7 consumiram em média 107,09 kcal/d; sendo 57,15 kcal/d provenientes da dieta líquida o que corresponde a 53,52% da energia ingerida diariamente (Tabela 3 e Figura 7).

Tabela 3 - Médias e desvio-padrão dos dados nutricionais do grupo das fêmeas

GRUPO	Solução líquida ingerida (ml/d)	álcool ingerido (kcal/d)	ração ingerida (g/d)	ração ingerida (kcal/d)	dieta total (kcal/d)
FG1	28.01 ± 5.81	0.00	16.84 ± 3.73	45.47 ± 10,07)	45.47 ± 10.07
FG2	20.05 ± 3.81	11.23 ±2.14	12.52 ±2.07	33.80 ±5.58)	45.03 ±7.29
FG4	17.53 ± 2.69	19.63 ±3.01	11.50 ±2.66	31,05 ±7.19)	50.68 ±8.73
FG6	34.02 ± 4.23	57.15 ±7,11	18.49 ±3.15	49.94 ± 8.50)	107.09 ±11.61

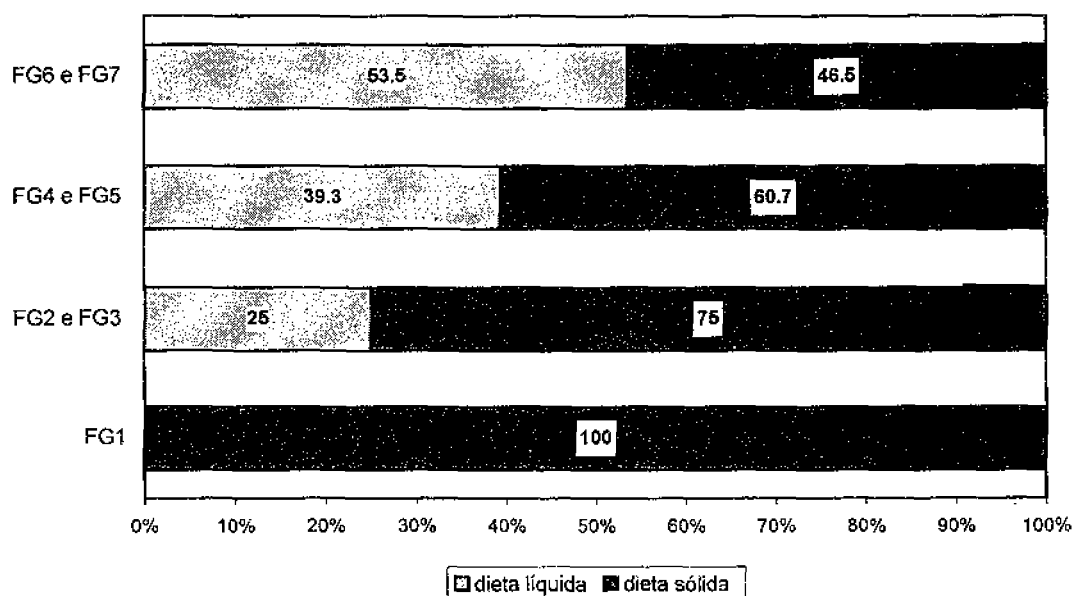


FIGURA 7- Percentual (%) médio de calorías da dieta líquida e sólida consumida pelos ratos fêmeas.

Analisando os dados provenientes da quantidade de solução líquida ingerida diariamente pelos ratos machos, pode-se observar que em MG1 e MG2 os valores foram similares (48,22 e 49,10 ml, respectivamente), apresentando-se levemente reduzidos em MG4 (43,26 ml) e profundamente reduzidos em MG6 (26,27 ml) (Tabela 4). Em relação à quantidade de calorias ingeridas pelos grupos de ratos foi observado que as ratas de MG1 consumiram 110,49 calorias diárias (kcal/d), todas provenientes da dieta sólida. Os animais MG2 e de seu grupo isocalórico MG3 consumiram em média 126,01 kcal/d, sendo 27,50 kcal/d, ou seja, 22% provenientes da dieta líquida (solução alcoólica/solução de sacarose). Já as ratas de MG4 e de seu grupo isocalórico MG5 consumiram em média 133,54 kcal/d; sendo 48,45 kcal/d oriundas da dieta líquida o que corresponde a 36,6% das calorias totais da dieta. E as ratas de MG6 e MG7 consumiram em média 95,06 kcal/d; sendo 43,50 kcal/d provenientes da dieta líquida o que corresponde a 45,8% das calorias totais da dieta (Tabela 4 e Figura 8).

Tabela 4 - Médias e desvio-padrão dos dados nutricionais dos ratos machos

GRUPO	solução líquida ingerida (ml/d)	álcool ingerido (kcal/d)	ração ingerida (g/d)	ração ingerida (kcal/d)	dieta total (kcal/d)
MG1	48.22 ± 1.33	0.00	40.92 ± 9.96	110.49 ± 26.90	110.49 ± 26.90
MG2	49.10 ± 1.95	27.50 ±1.09)	36.72 ±3.94	98.51 ±10.65	126.01 ±11.09
MG4	43.26 ± 4.06	48.45 ±4.55)	31.52 ±5.47	85.09 ±14.78	133.54 ±17.34
MG6	26.27 ± 3.63	43.50 ±5.99)	19.09 ±2.47	51.55 ± 6.67	95.06 ±9.56

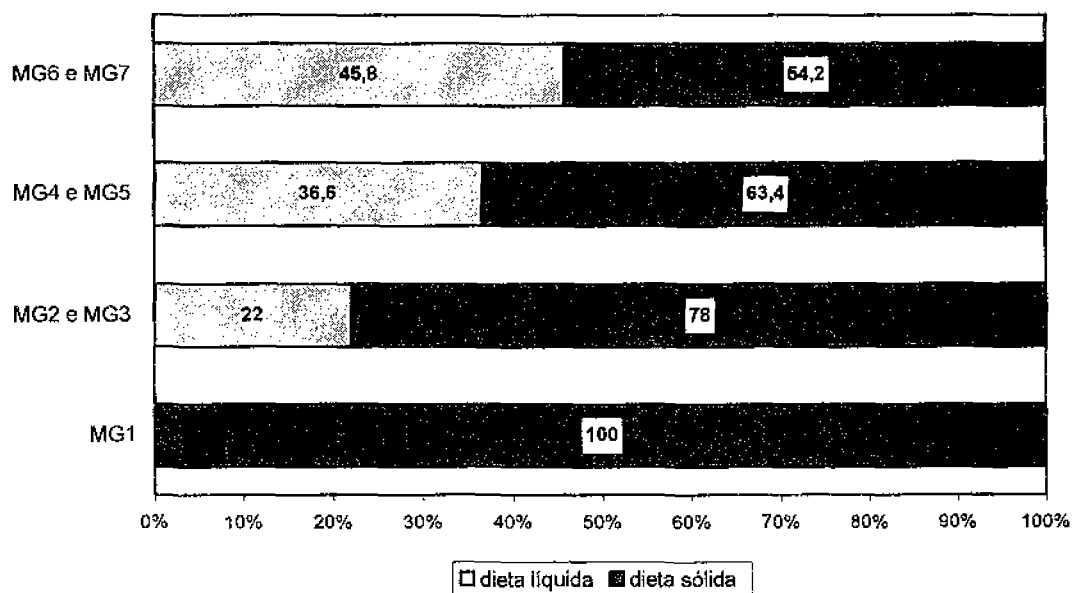


FIGURA 8 - Percentual médio (%) da dieta líquida e sólida consumida pelos ratos machos

### 5.3 Alterações morfológicas do fêmur

#### 5.3.1 Comprimento do fêmur

Nas fêmeas o comprimento do fêmur não mostrou diferença significativa (teste de DUNNET) entre os grupos com diferente concentração de álcool (FG2:  $36,35 \pm 0,63$ ; FG4:  $36,72 \pm 0,75$ ; FG6:  $35,98 \pm 0,41$ ) em relação ao grupo controle (FG1:  $36,4 \pm 0,49$ ), como observado no Figura 9.

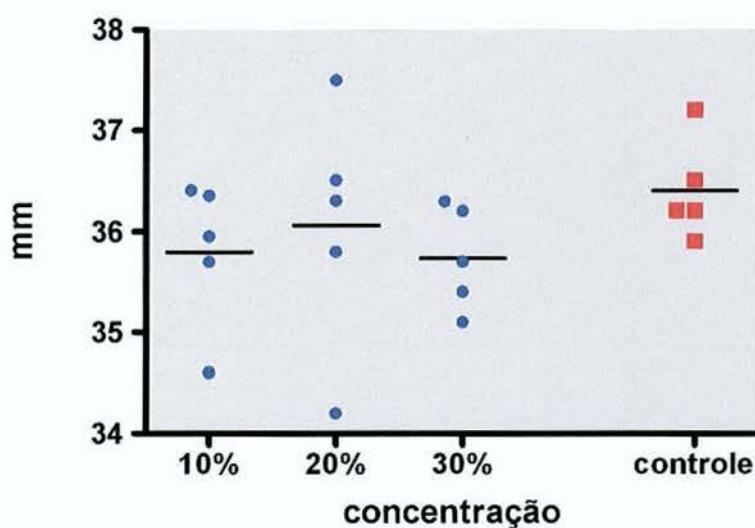


FIGURA 9 - Distribuição dos valores de comprimento do fêmur das fêmeas tratadas com diferentes concentrações de álcool em relação ao grupo controle.

Aplicado o teste ANOVA para avaliar as variáveis tratamento, sexo e concentração, foi verificado que só não houve diferença significativa quando foi avaliada a relação sexo x tratamento (Tabela 5).

Tabela 5 - Dados de comprimento do fêmur relacionando sexo, tratamento e concentração.

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
Sexo	1	257,332	257,332	430,16	0,001*
Tratamento	1	8,320	8,320	13,91	0,001*
Concentração	2	12,682	6,431	10,60	0,001*
Sexo vs Tratamento	1	0,899	0,899	1,50	0,226
Sexo vs Concentração	2	17,072	8,536	14,27	0,001*
Tratamento vs Concentração	2	15,802	7,901	13,21	0,001*
Sexo vs Tratamento vs Concentração	2	3,923	1,961	3,28	0,046*
Resíduo	48	28,715	0,598		
Total	59	344,743			

\*p<0,05

No teste ANOVA seguido do teste de Comparação Múltipla de Tukey (5%) pode ser observado que todos os ratos fêmeas, tanto do grupo que recebeu álcool, como grupo que recebeu sacarose, apresentaram menor comprimento do fêmur em relação aos machos. Pode ser verificado que o MG6 apresentou comprimento estatisticamente inferior de fêmur em relação aos demais machos. Entretanto, nas fêmeas não houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6 - Média do comprimento do fêmur em relação as variáveis sexo, tratamento e concentração.

GRUPO	Concentração	Média	Grupos homogêneos	
MG3	10%	41.708	A	
MG2	10%	42.098	A	
MG5	20%	40.936	A	
MG4	20%	40.712	A	
MG7	30%	41.070	A	
MG6	30%	37.936	B	
FG7	30%	37.214	B	C
FG5	20%	36.900	B	C
FG4	20%	36.720	B	C
FG3	10%	36.440	B	C
FG2	10%	36.350	B	C
FG6	30%	35.984	C	

### 5.3.2 Largura méso-distal

Aplicado o teste ANOVA, para avaliar os dados da largura méso-distal do fêmur segundo as variáveis tratamento, sexo e concentração, foi verificado que houve diferença significativa em relação ao sexo, concentração e sexo versus concentração (Tabela 7).

Tabela 7- Dados da largura méso-distal do fêmur (mm) relacionando sexo, tratamento e concentração.

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
Sexo	1	8,83201	8,83201	223,37	0,0001*
Tratamento	1	0,00353	0,00353	0,09	0,7665
Concentração	2	0,3397	0,16985	4,30	0,0192*
Sexo vs Tratamento	1	0,01473	0,01473	0,37	0,5445
Sexo vs Concentração	2	0,5005	0,25025	6,33	0,0336*
Tratamento vs Concentração	2	0,2217	0,11083	2,80	0,0706
Sexo vs Tratamento vs Concentração	2	0,1399	0,06993	1,77	0,1815
Resíduo	48	1,8979	0,03954		
Total	59				

\*p<0,05

A análise ANOVA seguida do teste de Comparação Múltipla de Tukey (5%) indicou que a largura média dos fêmures dos machos foi maior que a das fêmeas. Nos machos, os grupos que receberam dieta alcoólica (MG2, MG4 e MG6) não diferiram quanto à largura méso-distal. Nas fêmeas, o grupo FG6 foi estatisticamente maior do grupo FG2 e FG4 (Tabela 8).

Tabela 8 - Valores médios (mm) de largura méso-distal de acordo com as variáveis: sexo e concentração.

GRUPO	Concentração	Média	Grupos homogêneos
MG2	10%	4.7860	A
MG6	30%	4.7310	A
MG4	20%	4.7210	A
FG6	30%	4.2060	B
FG4	20%	3.9100	C
FG2	10%	3.8200	C

### 5.3.3 Largura ântero-posterior

Aplicado o teste ANOVA, para avaliar os dados da largura ântero-posterior do fêmur segundo as variáveis tratamento, sexo e concentração, foi verificado que houve diferença significativa em relação ao sexo e em relação à concentração (Tabela 9).

Tabela 9 - Dados da largura ântero-posterior do fêmur (valores em mm) relacionando sexo, tratamento e concentração.

Efeito	gl	SQ	QM	F	p
Sexo	1	7,217	7,21760	167,35	0,0001*
Tratamento	1	0,0687	0,06868	1,59	0,2131
Concentração	2	0,4201	0,21005	4,87	0,0119*
Sexo vs Tratamento	1	0,0313	0,03128	0,73	0,3986
Sexo vs Concentração	2	0,0745	0,03725	0,86	0,4281
Tratamento vs Concentração	2	0,0225	0,01125	0,26	0,7715
Sexo vs Tratamento vs Concentração	2	0,0973	0,04865	1,13	0,3321
Resíduo	4	2,0702	0,04313		
	8				
Total	5	10,0021			
	9				

\*p<0,05

As médias das larguras ântero-posteriores do fêmur tanto nas fêmeas quanto nos machos não apresentaram diferença significativa entre os grupos experimentais considerando-se o gênero dos animais, o que pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10 - Média da largura ântero-posterior dos fêmures em relação as variáveis sexo, tratamento e concentração.

GRUPO	Concentração	Média	Grupos homogêneos	
MG3	10%	3.6480	A	B
MG2	10%	3.6580	A	B
MG5	20%	3.8040	A	
MG4	20%	3.7580	A	
MG7	30%	3.7780	A	
MG6	30%	3.6560	A	B
FG3	10%	2.8800		C
FG2	10%	2.8400		C
FG5	20%	3.2600	B	C
FG4	20%	3.0000		C
FG7	30%	3.1000		C
FG6	30%	3.0600		C

#### 5.3.4 Espessura radiográfica da cortical óssea

Pode ser observado que nas fêmeas a espessura da cortical não diferiu estatisticamente (ANOVA, Tukey) nem para as diferentes concentrações de álcool nem entre o grupo álcool e seu isocalórico associado (Tabela 11).

TABELA 11 - Médias da espessura da cortical dos fêmures das fêmeas em relação ao sexo, tratamento e concentração.

GRUPO	Concentração	Média	Grupos homogêneos		
FG3	10%	1.2520	A	B	C
FG2	10%	1.0720			C D
FG5	20%	0,9320			D
FG4	20%	1.1180		B	C D
FG7	30%	1.3160	A	B	
FG6	30%	1.2140		B	C

No grupo dos machos não houve diferença estatística na espessura da cortical dos fêmures em nenhum dos tratamentos com álcool (Tabela 12), assim como entre os grupos isocalóricos (Figura 10) em relação ao grupo controle. Ou seja, não existiu diferença estatística para o parâmetros espessura da cortical em relação aos ratos machos.

Tabela 12 - Médias da espessura da cortical (mm) dos fêmures dos machos que receberam álcool em relação ao grupo controle.

GRUPO	Médias	Diferença médias vs controle (média = 1,280)	Erro padrão da diferença	t*	p
MG2	1,5320	0,2520		2,277	0,0911
MG4	1,4940	0,2140	0,1107	1,934	0,1682
MG6	1,5500	0,2700		2,439	0,0671

\*p<0,05

\*t 5(%)(gl = 16) = 2,593

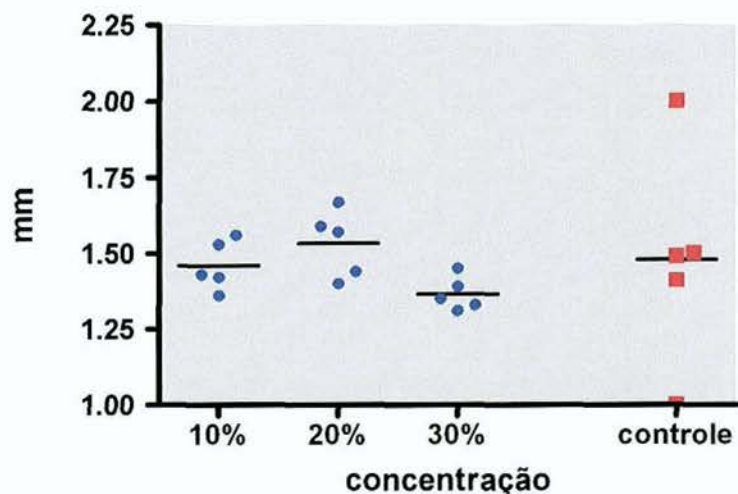


FIGURA 10 - Valores médios da espessura da cortical dos grupos isocalóricos para os ratos machos em relação ao grupo controle.

### 5.3.5 Análise percentual do trabeculado ósseo

Considerando o percentual do trabeculado ósseo do fêmur das fêmeas que receberam dietas isocalóricas não foi observada diferença em relação ao grupo controle (Tabela 13).

Em relação às fêmeas nota-se (ANOVA, Tukey) que somente as do álcool 30% apresentaram diminuição do percentual de trabeculado ósseo em relação às outras concentrações alcoólicas e aos grupos isocalóricos (Tabela 14).

Tabela 13 - Valores médios do percentual ósseo trabecular das fêmeas isocalóricas em relação controle.

GRUPO	Médias	Diferença médias vs controle (média = 63,616)	Erro padrão da diferença	t*	p
FG2 <sup>5</sup>	73,862	10,246		2,387	0,0742
FG4 <sup>5</sup>	70,736	7,120	4,293	1,659	0,2643
FG6 <sup>7</sup>	70,800	7,184		1,673	0,2581

\*t 5(%)(<sub>gl = 16</sub>) = 2,593

Tabela 14 - Valores médios do percentual ósseo trabecular das fêmeas considerando sexo, tratamento e concentração.

GRUPO	Concentração	Média	Grupos homogêneos
FG3	10%	73.862	A
FG2	10%	76.590	A
FG5	20%	70.736	A
FG4	20%	75.508	A
FG7	30%	70.800	A
FG6	30%	54.890	B

Considerando as alterações no percentual de trabecular ósseo, verificou-se para o grupo dos machos redução significativa de todas as concentrações alcoólicas em relação ao grupo controle (Tabela 15 e Figura 11).

Tabela 15 - Valores médios do percentual ósseo trabecular nos grupos que receberam álcool em relação ao grupo controle nos machos.

GRUPO	Médias	Diferença médias vs controle (média = 86,100)	Erro padrão da diferença	t*	p
MG2	61,244	24,856		4,637	0,0008*
MG4	60,478	25,622	5,360	4,780	0,0006*
MG6	46,168	39,932		7,450	0,0001*

\*p<0,05

\*t 5%(gl = 16) = 2,593

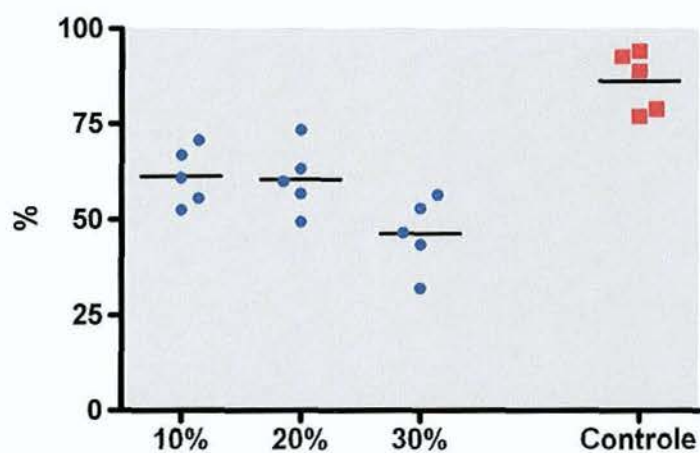


FIGURA 11 - Distribuição dos valores médios do percentual de trabecular ósseo sob tratamento alcoólico para os ratos machos em relação ao grupo controle.

Aplicando o teste ANOVA intergrupo, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (5%) para avaliar as variações no percentual de osso trabecular, verificou-se no grupo dos machos que receberam álcool o MG6 foi estatisticamente inferior em relação ao MG2 e MG4, que por sua vez foram semelhantes entre si (Tabela 16).

Em relação ao grupo do álcool e seus isocalóricos, verifica-se que para o grupo álcool MG4 não diferiu do seu isocalórico. No entanto, tanto o MG2 quanto o MG6 apresentaram menor percentual de trabéculas que seus isocalóricos associados.

Tabela 16 - Valores médios do trabeculado ósseo dos fêmures em relação ao sexo, tratamento e concentração para os machos.

GRUPO	Concentração	Média	Grupos homogêneos	
MG3	10%	86.716	A	
MG2	10%	61.244	B	
MG5	20%	64.480	B	
MG4	20%	60.478	B	
MG7	30%	70.512	A	B
MG6	30%	46.168	C	

### 5.3.6 Análise da densidade óptica

Os dados foram expressos em média e desvio padrão por grupo e o teste ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Tukey (5%) foi aplicado, separadamente para as fêmeas e para os machos, para ver se existia diferença entre os grupos e quais diferiam entre si, considerando o gênero dos animais.

Verificou-se nas fêmeas, que os grupos FG1, FG2, FG3 e FG5 não diferiram entre si. O grupo FG4 apresentou valor de densidade superior a todos os demais grupos, FG6 e FG7 tiveram seus valores de densidade iguais entre si e inferiores aos demais. Dessa forma, pode-se observar que não houve alteração estatística para a concentração alcoólica de 10%, enquanto a concentração de 20% teve sua densidade aumentada e a concentração de 30% sua densidade reduzida. Somente o grupo isocalórico FG7 diferiu do grupo controle e dos demais isocalóricos, apresentando-se com menor densidade, assim como seu grupo álcool associado (Tabela 17).

Tabela 17- Valores médios e desvio padrão da densidade óptica (mmAl) de acordo com o tratamento e concentração para as fêmeas.

GRUPO	Concentração	Média (dp)	Grupos homogêneos
GF1	-	1.304 ± 0.052	A
GF2	10%	1.310 ± 0.075	A
GF3	10%	1.285 ± 0.139	A
GF4	20%	1.596 ± 0.067	B
GF5	20%	1.214 ± 0.144	A
GF6	30%	0.975 ± 0.109	C
GF7	30%	1.060 ± 0.085	C

Avaliando a densidade óptica dos machos, verificou-se por meio da ANOVA que houve diferença entre os grupos experimentais ( $p=0,01696$ ), sendo MG5 e MG6 distintos dos demais. Considerando as concentrações alcoólicas a densidade para o grupo álcool 30% foi significativamente menor que as demais. Quanto aos grupos isocalóricos, MG3 e o MG7 não diferiram do grupo controle, porém MG5 apresentou densidade maior que todos os demais grupos (Tabela 18).

Tabela 18 - Valores médios e desvio padrão da densidade óptica (mmAl) de acordo com o tratamento e concentração para os machos.

GRUPO	Concentração	Média (dp)	Grupos homogêneos
GM1	-	1.393 ± 0.037	A
GM2	10%	1.398 ± 0.103	A
GM3	10%	1.415 ± 0.057	A
GM4	20%	1.410 ± 0.069	A
GM5	20%	1.508 ± 0.075	B
GM6	30%	1.260 ± 0.042	C
GM7	30%	1.422 ± 0.021	A

## 6 DISCUSSÃO

O álcool é uma substância que apresenta efeitos farmacológicos no sistema nervoso central por interagir com receptores específicos (BITTENCOURT<sup>8</sup>, 2000; FLEMING et al.<sup>27</sup>, 2003; CARDOSO et al.<sup>17</sup>, 2005) com efeitos em vários sistemas devido ao metabolismo hepático (LIEBER<sup>47, 48</sup>, 2000 e 2003) e também atua sobre o tecido ósseo, principalmente nos osteoblastos (KLEIN<sup>42</sup>, 1997). Tem sido identificado como um dos fatores de risco para a osteoporose induzindo a perda de massa óssea (EASTELL et al.<sup>25</sup>, 1998; ORLIC & RAIZ<sup>60</sup>, 1998; RIGGS et al.<sup>69</sup>, 2002; LANGER<sup>43</sup>, 2004; VONDRACEK & HANSEN<sup>90</sup>, 2004).

O consumo moderado de álcool aumenta os níveis de estradiol na mulher pós-menopausa e em homens apresentando um efeito protetor, sendo este mais evidente nas mulheres. O consumo de álcool, em ratos machos, diminui os níveis circulantes de testosterona, enquanto aumenta a produção de estradiol através da aromatização da testosterona, isto é, o álcool faz com que a testosterona se converta em estradiol, apresentando efeito protetor também no sexo masculino (KIMBLE<sup>41</sup>, 1997; TURNER & SIBONGA<sup>87</sup>, 2001; COMPSTON<sup>19</sup>, 2001).

Sendo assim, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar e comparar o efeito do consumo crônico do álcool no fêmur de ratos

machos e fêmeas, em três concentrações diferentes, diariamente, durante oito semanas.

Estudos em humanos são difíceis de interpretar devido ao pequeno número de pacientes e pela grande variabilidade dos mesmos quanto à idade, duração do consumo, padrão de abuso do álcool e interferência dos fatores de risco (TURNER<sup>86</sup>, 2000). É muito difícil também o controle da questão nutricional, visto que os etilistas em geral apresentam grandes partes das calorias ingeridas derivadas do etanol (LIEBER<sup>47</sup>, 2000), que são frequentemente associadas à redução de peso corporal (LIEBER<sup>48</sup>, 2003).

Devido a esses fatores, no presente estudo foi empregado como modelo animal ratos, com a finalidade de superar as limitações dos estudos em humanos, permitindo cuidadoso controle do peso dos mesmos e da questão nutricional. Pode-se verificar na literatura que muitos estudos utilizam o rato, como modelo já consagrado, para avaliar os efeitos do consumo de álcool sobre o tecido ósseo (SZEJNFELD<sup>82</sup>, 2000; PENG et al.<sup>61</sup>, 1988; TURNER et al.<sup>88</sup>, 2001; HOGAN et al.<sup>36</sup>, 1997; SAMPSON<sup>74</sup>, 1998; DYER et al.<sup>23</sup>, 1998, HOGAN et al.<sup>37</sup>, 2001; ELMALI et al.<sup>26</sup>, 2002; REED et al.<sup>68</sup>, 2002; CALLACI et al.<sup>16</sup>, 2004).

O período experimental empregado neste trabalho foi baseado em estudos prévios que demonstraram o efeito deletério do consumo de álcool no tecido ósseo administrado por oito semanas (HOGAN et al.<sup>36</sup>, 1997; HOGAN et al.<sup>37</sup>, 2001) ou em menor tempo

experimental (DYER et al.<sup>23</sup>, 1998; HOGAN et al.<sup>36</sup>, 1997; SAMPSON & SPEARS<sup>77</sup>, 1999; HEFFERAN et al.<sup>35</sup>, 2003; WEZEMAN et al.<sup>94</sup>, 2003; CALLACI et al.<sup>16</sup>, 2004) associada à dieta líquida com 35% de calorias provenientes do etanol.

Devido a impossibilidade de acesso à referida dieta previamente preparadas como na maioria dos trabalhos da literatura, no nosso experimento foram empregadas concentrações diferentes de álcool, que foram fornecidas aos animais, que as consumiram livremente associadas à ração convencional. Ao final do experimento, calculou-se o valor energético da dieta e o correspondente calórico derivado do álcool, obtendo-se para a concentração de 10%: 25% para o grupo das fêmeas e 22% para o grupo dos machos de calorias oriundas do álcool; para a concentração de 20%: 39% para as fêmeas e 36% para os machos de calorias provenientes do álcool e para a concentração de 30%: 53% para as fêmeas e 46% para os machos.

Pelos dados nutricionais do nosso experimento a concentração de 20% corresponde à maioria dos trabalhos da literatura, com resultados deletérios em relação ao tecido ósseo (HOGAN et al.<sup>36</sup>, 1997; SAMPSON et al.<sup>78</sup>, 1997; SAMPSON<sup>74</sup>, 1998; DYER et al.<sup>23</sup>, 1998; SAMPSON & SPEARS<sup>77</sup>, 1999; HOGAN et al.<sup>37</sup>, 2001; WEZEMAN & GONG<sup>93</sup>, 2001; TURNER et al.<sup>88</sup>, 2001; TURNER et al.<sup>89</sup>, 2001; REED et al.<sup>68</sup>, 2002; WEZEMAN et al.<sup>94</sup>, 2003); embora trabalhos que utilizam concentrações menores também atingiu o tecido ósseo (PENG et al.<sup>61</sup>,

1988; SAMPSON & SHIPLEY.<sup>76</sup>, 1997; TURNER et al.<sup>88</sup>, 2001; ELMALI et al.<sup>26</sup>, 2002; NYQUIST et al.<sup>59</sup>, 2002; CALLACI et al.<sup>16</sup>, 2004).

A instituição dos grupos isocalóricos em nosso experimento teve a finalidade de diferenciar o efeito direto e indireto do álcool sobre o tecido ósseo, visto que a partir de 30% de calorias provenientes das bebidas alcoólicas leva a uma diminuição de proteínas e vitaminas levando a um quadro de desnutrição (LIEBER<sup>47</sup>, 2000; LIEBER<sup>48</sup>, 2003). No presente estudo, assim como em outros que avaliam o tecido ósseo (COLANTONI et al.<sup>18</sup>, 2000; HOGAN et al.<sup>37</sup>, 2001; REED et al.<sup>68</sup>, 2002; HEFFERAN et al.<sup>35</sup>, 2003), os grupos isocalóricos serviram como controle nutricional simulando a deficiência associada à dieta alcoólica.

É importante ressaltar que o experimento foi realizado em duas etapas distintas, que corresponderam a diferentes estações climáticas do ano. Por este motivo, houve discrepância no aumento do consumo observado nas fêmeas 30%, as quais foram realizadas no verão conjuntamente com as três concentrações dos machos.

Quanto à idade, os nossos animais no início do experimento tinham quatro meses de idade e no final seis meses, sendo considerado pela literatura um adulto de trinta anos (SAMPSON<sup>75</sup>, 2002). Esta questão da idade é importante, uma vez que a resposta do álcool sobre o tecido ósseo em desenvolvimento é diferente em relação a ossos maduros. Dados da literatura mostram que o álcool administrado

moderadamente à mulheres com mais de 65 anos apresenta efeito protetor no entanto, em jovens, ocorre o risco de desenvolver diminuição da massa óssea (SAMPSON<sup>73, 75</sup>, 1998 e 2002).

A idade dos animais em nosso trabalho pode ter influenciado os resultados, pelo fato do nosso animal ser considerado no início do experimento um adulto jovem, embora trabalhos com animais de idade inferior aos nossos que receberam álcool tenham demonstrado efeito sobre o osso (SAMPSON & SPEARS<sup>77</sup>, 1999; WEZEMAN & GONG<sup>93</sup>, 2001; ELMALI et al.<sup>26</sup>, 2002; NYQUIST et al.<sup>59</sup>, 2002; WEZEMAN et al.<sup>94</sup>, 2003; CALLACI et al.<sup>16</sup>, 2004).

O fêmur foi o osso escolhido por nós, por ser o mais utilizado e estudado por diversos autores em experimentação animal (PENG et al.<sup>61</sup>, 1988, SAMPSON & SHIPLEY<sup>76</sup>, 1997; SAMPSON & SPEARS<sup>77</sup>, 1999; HOGAN et al.<sup>36, 37</sup>, 1997 e 2001; WEZEMAN & GONG<sup>93</sup>, 2001; NYQUIST et al.<sup>59</sup>, 2002; CALLACI et al.<sup>16</sup>, 2004), além de ser o mais importante na avaliação da osteoporose pela técnica da densitometria em humanos (SZEJNFELD<sup>82</sup>, 2000; BAE & STEIN<sup>5</sup>, 2004; FUKS<sup>29</sup>, 2004, LANGER<sup>43</sup>, 2004, VONDRACEK & HANSEN<sup>90</sup>, 2004. BRANDÃO & HAUACHE<sup>13</sup>, 2005).

Um dos parâmetros avaliados no nosso trabalho foi o peso do animal ao decorrer do experimento, uma vez que o álcool tem alto nível de calorias, e como relatado na literatura o indivíduo que bebe, não se alimenta, pois fornece ao seu organismo altas calorias oriundas do

próprio álcool, embora estas sejam consideradas de calorias "vazias", sem nenhum valor nutritivo e associadas à perda de peso e não manutenção da massa óssea (LIEBER<sup>48</sup>, 2003).

Nos nossos resultados, no grupo das fêmeas e nos machos nas concentrações de 20 e 30% respectivamente, houve perda de peso, dados estes que se equiparam com os trabalhos de Nyquist, et al.<sup>59</sup>, 2002, Hogan et al.<sup>37</sup>, 2001, Wezeman & Gong<sup>93</sup>, 2001; WEZEMAN et al.<sup>94</sup>, 2003, embora em alguns trabalhos o álcool tenha sido administrado por períodos diferentes e os animais também com sexo e idade diferentes. Ainda quanto ao peso dos animais, as fêmeas que receberam dieta alcoólica nas concentrações de 10 e 30%, além dos machos nas concentrações de 10 e 20% não alteraram seu peso durante o experimento, o que concordou com alguns trabalhos onde não se verificou alteração no peso dos animais (TURNER et al.<sup>88</sup>, 2001; REED et al.<sup>68</sup>, 2002; ELMALI et al.<sup>26</sup>, 2002; CALLACI et al.<sup>16</sup>, 2004).

Os resultados verificados quanto às alterações externas no fêmur não mostraram diferença de comprimento e largura ântero-posterior para as fêmeas nas três concentrações, no entanto, houve uma maior distância méso-distal no fêmur das fêmeas do grupo álcool 30%. Nos machos houve redução do comprimento na concentração de 30%, sendo que a largura ântero-posterior e méso-distal não diferiram entre os grupos experimentais. Pode-se, provavelmente, atribuir estas alterações observadas como característica anatômica dos animais que constituíram

esse grupo e não devido a reais alterações ocasionadas pelo consumo de álcool. Outro fator importante a ser relacionado seria que os animais deste trabalho, desde o começo do experimento, já apresentavam tamanhos bastante diferentes, sendo os machos muito maiores que as fêmeas.

Considerando os recursos de avaliação das medidas ósseas externas, verifica-se que Hogan et al.<sup>37</sup> (2001) avaliando o comprimento não identificaram alterações significativas entre os grupos de tratamento em fêmeas de nove meses com administração de álcool (35% de calorias da dieta oriundas do álcool) por oito e quatorze semanas; no entanto com o emprego de outros critérios para verificar as propriedades físicas, extrínsecas e intrínsecas o efeito negativo do álcool foi evidenciado. Além deste autor, Nyquist et al.<sup>59</sup>, 2002 também não observou alteração no comprimento do fêmur. No entanto, trabalhos de Sampson & Spears<sup>77</sup>, 1999 e Hogan et al.<sup>37</sup>, 2001, empregando dieta com 35% das calorias provenientes do álcool demonstraram diminuição do diâmetro do fêmur. Sendo assim, pode-se sugerir que esse recurso de avaliação para medidas externas utilizadas no presente trabalho apresentaram pouca sensibilidade para detectar alterações ósseas.

Devido ao fato de existir maior suscetibilidade de ocorrer interferência no osso trabecular do que no osso cortical durante o processo de remodelação óssea (RANG et al.<sup>67</sup>, 2004; CALERO et al.<sup>15</sup>, 2000; GUEDES JÚNIOR et al.<sup>32</sup>, 2003; FUKS<sup>29</sup>, 2004) espera-se respostas distintas nas avaliações de espessura da cortical e do

percentual trabecular do fêmur. Dessa forma, o presente estudo encontrou comportamentos diferentes entre esses dois tipos de ossos no mesmo gênero do animal.

Para os machos não foi observada nenhuma variação da espessura da cortical óssea, porém houve redução do osso trabecular. Verificou-se redução no percentual de osso trabecular nas três concentrações alcoólicas, sendo a redução mais acentuada na concentração de 30% em relação às demais, atribuídas ao efeito direto do etanol. Além disso, houve redução no percentual de osso trabecular no grupo isocalórico associado ao álcool 20%, indicando efeito indireto, provavelmente atribuído à desnutrição ocorrida nesse grupo. No entanto, no isocalórico associado ao álcool 30% não foi observada redução do percentual trabecular em relação ao seu isocalórico. Este fato era esperado, pois segundo Lieber<sup>48</sup> (2003) pode ocorrer comprometimento nutricional quando o fornecimento calórico de origem alcoólica ultrapassar trinta por cento das calorias totais da dieta.

Existem indícios da ocorrência de desequilíbrio no remodelamento ósseo, levando ao predomínio da reabsorção óssea em adultos jovens que abusam do álcool em ambos os gêneros (TURNER & SIBONGA<sup>87</sup>, 2001). No entanto, existem poucas evidências que estimam o efeito do álcool no tecido ósseo das mulheres, parecendo esse ser influenciado pela etapa de desenvolvimento do animal (HOGAN et al.<sup>36</sup>,

1997), tempo de consumo (HOGAN et al.<sup>37</sup>, 2001) e nível de consumo (TURNER et al.<sup>88</sup>, 2001).

Para as fêmeas não foi observada nenhuma variação da espessura da cortical óssea, porém houve alteração no osso trabecular com redução do percentual de trabéculas apenas na concentração alcoólica de 30%, sendo provavelmente decorrente unicamente do efeito direto do álcool e não havendo prejuízo na condição nutricional, visto que não houve alteração no seu correspondente isocalórico. Esses resultados podem ser explicados, pois a presença do álcool pode influenciar a forma como o estrógeno interage com o tecido ósseo, aumentando seu efeito protetor, pois o álcool reduz sua velocidade de metabolização, possibilitando maiores níveis circulatórios do hormônio, além de inibir o processo de remodelação (TURNER & SIBONG<sup>87</sup>, 2001).

A diminuição do osso trabecular como consequência do consumo demonstrada por nós, também é observada em vários trabalhos (PENG et al.<sup>61</sup>, 1988; DYER et al.<sup>23</sup>, 1998; HOGAN et al.<sup>37</sup>, 2001; SAMPSON & SHIPLEY<sup>76</sup>, 1997; SAMPSON et al.<sup>78</sup>, 1997; SAMPSON<sup>74</sup>, 1998; TURNER et al.<sup>88</sup>, 2001; REED et al.<sup>68</sup>, 2002), os quais <sup>afirmam</sup> afirmam que essa diminuição provavelmente está associada à interferência do álcool sobre a proliferação dos osteoblastos (SAMPSON<sup>74</sup>, 1998; DYER et al.<sup>23</sup>, 1998; TURNER et al.<sup>88</sup>, 2001).

Ao analisarmos o comportamento da densidade óptica medida na região da diáfise de imagens radiográficas digitais foi verificado

respostas distintas nos ratos machos em relação às fêmeas. Nas fêmeas, a densidade foi maior na concentração alcoólica de 20%, provavelmente devido ao efeito protetor do álcool mais evidente nas fêmeas (TURNER & SIBONGA<sup>87</sup>, 2001). Além disso, a densidade apresentou-se reduzida tanto na concentração alcoólica de 30% como no seu isocalórico, sugerindo ocorrência de efeito direto do álcool no tecido ósseo (KLEIN<sup>42</sup>, 1997) e indireto devido ao comprometimento nutricional que afeta o tecido ósseo para essa concentração nas fêmeas. Já para os machos, observou-se redução da densidade óptica apenas para a concentração alcoólica de 30%, não sendo essa redução verificada no seu isocalórico correspondente, indicando apenas efeito direto do álcool no tecido ósseo na maior concentração empregada. Estes dados de diminuição da densidade óptica são concordantes com os trabalhos de Sampson & Spears<sup>77</sup> (1999), Elmali et al.<sup>26</sup> (2002), Nyquist et al.<sup>59</sup> (2002), Wezeman et al.<sup>94</sup> (2003) e Callaci et al.<sup>16</sup> (2004).

Os resultados do presente estudo permite sugerir que o tempo experimental de oito semanas, utilizado por nós, pode não ter sido suficiente para alterar a estrutura óssea cortical tanto nos machos quanto nas fêmeas. No entanto, a estrutura trabecular foi alterada com concentrações menores de álcool nos machos do que nas fêmeas. A densidade óptica apresentou-se reduzida apenas na maior concentração utilizada tanto nos machos quanto nas fêmeas; porém, distintamente aos

demais resultados a densidade foi aumentada em concentrações intermediárias nas fêmeas.

Nossos resultados indicam que os machos demonstraram piores efeitos do álcool sobre o tecido ósseo que as fêmeas, discordando da literatura que afirma serem as mulheres mais sensíveis ao efeito do álcool que os homens. Essa diferença é devido ao fato das mulheres apresentarem na sua constituição maior quantidade de gordura, menor quantidade de água, menor massa corpórea, levando a concentrações alcoólicas mais elevadas no sangue associada a mesma quantidade de álcool ingerida pelo homem (LIMA<sup>49</sup>, 1998; PEREIRA et al.<sup>63</sup>, 2002 ALVES et al.<sup>2</sup>, 2003). No entanto, os ratos apresentam diferente forma de metabolização para o álcool em relação aos humanos. Segundo Almeida et al.<sup>1</sup> (1998) as fêmeas mantêm a preferência pelo etanol por maior tempo e são mais hábeis em metabolizá-lo com maior efetividade que os machos.

Trabalhos futuros que demonstrem o papel protetor do estrógeno sobre o tecido ósseo associado ao consumo de álcool seriam interessantes em animais ovariectomizados e orquiectomizados, pois demonstraria melhor qual a real influência da questão hormonal nas alterações geradas pelo álcool nos ossos.

## 7 CONCLUSÃO

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

- a) o efeito do álcool foi mais evidente nos machos;
- b) o efeito do álcool foi mais evidente no osso trabecular do que no cortical;
- c) os efeitos para os parâmetros avaliados dentro do mesmo gênero não apresentaram uma resposta dose-dependente;
- d) a maior concentração alcoólica (30%) foi a mais deletéria para o tecido ósseo.

## 8 REFERÊNCIAS\*

- 1 ALMEIDA, O.F.X. et al. Gender differences in ethanol preference and ingestion in rats. The role of the gonadal steroid environment. **J Clin Invest**, v. 101, p. 2677-85, 1998
- 2 ALVES, H.N.P.; FORMIGONI, M.L.O.S.; GUERRA, A.B.G. Problemas associados ao uso de bebidas alcoólicas. In: PRADO, F.C. et al. **Atualização terapêutica**. 21.ed. São Paulo: Artes Médicas, 2003. Seção 19, p.1507-71.
- 3 AMMANN, P. et al. The new selective estrogen receptor modulator MDL 103.323 increases bone mineral density and bone strength in adult ovariectomized rats. **Osteoporos Int**, v.10, p.369-76, 1999.
- 4 BABOR, T.F et al. The alcohol use disorders identification test: guidelines for use in primary care. Geneva: **WHO / PAHO**, 2001. v. 4, p. 1-40.
- 5 BAE, D.C.; STEIN, B.S. The diagnosis and treatment of osteoporosis in men on androgen deprivation therapy for advanced carcinoma of the prostate. **J Urol**, v.172, p.2137-44, Dec. 2004.

---

\* \* Baseado em:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação: referências, elaboração NBR 6023**. Rio de Janeiro. 2002. 23p.

- 6 BALZAN, S.M.P. et al. Osteoporose e álcool **J Bras Méd**, v.80, n.4, p.60-4, 2001.
- 7 BANDEIRA, F. et al. **Osteoporose**. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2000. p. 390.
- 8 BITTENCOURT, A.L. Mecanismo de ação do etanol: envolvimento de glutamato, gaba e dopamina. **Rev Psiq Clin**, v.27, n.1, p.26-31, 2000.
- 9 BLAIN, H. Osteoporosis in men: epidemiology, physiopathology, diagnosis, prevention and treatment. **Rev Med Interne**, v. 25, Suppl. 5, p. S552-9, Dec. 2004.
- 10 BLAKE, G.M.; FOGELMAN, I. Bone densitometry, steroids and osteoporosis. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.11, p.641-7, 2002.
- 11 BOBO, J.K. Tobacco use, problem drinking and alcoholism. **Clin Obst Gynecol**, v.45, n.4, p.1169-80, Dec. 2002.
- 12 BOYLE, W.J.; W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v.423, p.337-42, May 2003.
- 13 BRANDÃO, C.; HAUACHE, O.M. **Manual de doenças ósteo-metabólicas**. Cap. VI. Disponível em: [www.fleury.com.br](http://www.fleury.com.br). Acesso em: 22 jul.2005.
- 14 BRIENZA, R.S.; STEIN, M.D. Alcohol use disorders in primary care. Do gender-specific differences exist? **J Gen Intern Med**, v. 17, p. 387-97, May 2002.

- 15 CALERO, J. A. et al. Speed of sound, bone mineral density and bone strength in ooforectomized rats. **Eur J Clin Invest**, v.30, n.3, p.210-4, Mar. 2000.
- 16 CALLACI, J. J. et al. The effects of binge alcohol exposure on bone resorption and biomechanical and structural properties are offset by concurrent bisphosphonate treatment. **Alcohol Clin Exp Res**, v.28, n.1, p.182-91, Jan. 2004.
- 17 CARDOSO, S.H.; SABBATINI, R.M.E.; MALAVAZZI, A.L. **Ação do álcool no cérebro**. Porque o álcool relaxa. Disponível em: [www.cerebromente.org.br](http://www.cerebromente.org.br). Acesso em: 19 maio 2005.
- 18 COLANTONI, A. et al. Influence of sex hormonal status on alcohol-induced oxidative injury in male and female rat liver. **Alcohol Clin Exp Res**, v.24, n.9, p.1467-73, Sept. 2000.
- 19 COMPSTON, J. Secondary causes of osteoporosis in men. **Calcif Tissue Int**, v. 69, p.193-5, 2001.
- 20 COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. **Physiol Rev**, v.81, n.1, p.419-47, Jan. 2001.
- 21 DENK, J.; STUMPTNER, C.; ZATLOUKAL, K. Mallory bodies revisited. **J Hepatol**, v.32, p.689-702, 2000.
- 22 DUCY, P.; SCHINKE, T.; KARSENTY, G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. **Science**, v.289, n.1, p.1501-4, Sept. 2000.

- 23 DUFOUR, M.C. If you drink alcoholic beverages do so in moderation: what does this mean? **J Nutr**, v. 131, p. 552S-61S, 2001.
- 23 DYER, S. A.; BUCKENDAHL, P.; SAMPSON, H.W. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. **Alcohol**, v.16, n.4, p.337-41, 1998.
- 25 EASTELL, R. et al. Management of male osteoporosis: report of the UK Consensus Group. **Quarterly J Med**, v.91, n.2, p.71-92, Feb. 1998.
- 26 ELMALI, N. et al. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**, v.26, n.4, p.509-13, Apr. 2002.
- 27 FLEMING, M.; MIHIC, S.J.; HARRIS, R.A. Etanol. In: GOODMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p.325-37, 2003. Cap.18.
- 28 FUJIWARA, S. Epidemiology of osteoporosis. **Clin Calcium**, v.15, n.4, p. 577-82, Apr. 2005.
- 29 FUKS, A.G. **Diagnóstico e tratamento da osteoporose**. Disponível em: [www. medstudent.com](http://www.medstudent.com). Acesso em: 02 jun.2004.
- 30 GILBERT, S.M.; McKIERNAN, J.M. Epidemiology of male osteoporosis and prostate cancer. **Cur Op Urol**, v.15, p.23-7, 2005.

- 31 GONZALEZ-CALVIN, J.L. et al. Mineral metabolism, osteoblastic function and bone mass in chronic alcoholism. **Alcohol Alcohol**, v.28, n.5, p.571-9, Sept. 1993.
- 32 GUEDES JÚNIOR, F.S. et al. **Osteoporose**. 2003. 17f. Monografia (Obtenção de conceito na disciplina de Ortopedia e Traumatologia) - Escola de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Vitória, 2003.
- 33 HANNON, R.; EASTELL, R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. **Osteoporos Int**, v.6, p.S30-44, Suppl., 2000.
- 34 HARADA, S.; RODAN, G.A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v.423, p.349-55, May 2003.
- 35 HEFFERAN, T.E. et al. Disuse exaggerates the detrimental effects of alcohol on cortical bone. **Alcohol Clin Exp Res**, v.27, n.1, p.111-7, Jan. 2003.
- 36 HOGAN, H.A. et al. Alcohol consumption by young actively growing rats: a study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. **Alcohol Clin Exp Res**, v.21, n.5, p.809, Aug. 1997.
- 37 HOGAN, H.A. et al. Adult-onset alcohol consumption induces osteopenia in female rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v.25, n.5, p.746-54, May 2001.

- 38 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 8, p.136-53.
- 39 KAMEL, H.K. Male osteoporosis: new trends in diagnosis and therapy. **Drugs aging**, v.22, n.9, p. 741-8, 2005.
- 40 KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica and clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p.1054.
- 41 KIMBLE, R.B. Alcohol, cytokines and estrogen in the control of bone remodeling. **Alcohol Clin Exp Res**, v.21, n.3, p.385-91, May 1997.
- 42 KLEIN, R.F. Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. **Alcohol Clin Exp Res**, v.21, n.3, p.392-9, May 1997.
- 43 LANGER, A.L. **Osteoporose**: conceito geral e importância nos quadros de miopatia. Disponível em [http:// www. distrofia muscular.net/osteoporose.htm](http://www.distrofia muscular.net/osteoporose.htm). Acesso em: 02 jun.2004.
- 44 LAWSON, J. Drug-induced metabolic bone disorders. **Seminars Musculoskeletal Radiol**, v.6, n.4, p.285-97, 2002.
- 45 LEDER, B.Z. et al. Differential effects of androgens and estrogens on bone turnover in normal men. **J Clin Endocrinol Metab**, v.88, n.1, p.204-10, Jan. 2003.

- 46 LEDFORD, D. et al. Osteoporosis in the corticosteroid-treated patient with asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 102, n.3, p.353-62, Sept. 1998.
- 47 LIEBER, C. S. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. **Mount Sinal J Med**, v.67, n.1, p.84-94, Jan. 2000.
- 48 LIEBER, C.S. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. **Alcohol Res Health**, v.27, n.3, p.220-31, Jan. 2003.
- 49 LIMA, D.P. Alcoolismo. In: ROCHA, M.O.C. et al. **Terapêutica clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, Cap.19, p.1028-34.
- 50 LONGNECKER, M.P.; TSENG, M. Alcohol, hormones and postmenopausal women. **Alcohol Health Res World**, v.22, n.3, p.185-9, 1998.
- 51 MARQUES NETO, J. F. **Epidemia da osteoporose no Brasil**. Disponível em: [www.nutricaempauta.com.br](http://www.nutricaempauta.com.br). Acesso em: 19/05/2005.
- 52 McKILLOP, I. H.; SCHRUM, L.W. Alcohol and liver cancer. **Alcohol**, v.35, n.3, p.195-203, Apr. 2005.
- 53 MENDOZA-SASSI, R.A.; BÉRIA, J.U. Prevalence of alcohol use disorders and associated factors: a population-based study using AUDIT in southern Brazil. **Addiction**, v. 98, p.799-804, 2003.

- 54 MESSINGHAM, K.A.N.; FAUNE, D.F.; KOVACS, E.J. Alcohol, injury, and cellular immunity. **Alcohol**, v.28, p.137-49, July 2002.
- 55 MODESTO FILHO, J.; AZEVEDO, L.A.P.; AZEVEDO, L.C.P. Tratamento da osteoporose. **J Bras Med**, v.71, n.5/6, p.77-9, nov./dez. 1996.
- 56 MUNDY, G.R. Cellular and molecular regulation of bone turnover. **Bone**, v.24, n.5S, p.35S-38S, May 1999.
- 57 NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION. Disponível em: <http://www.nof.org.osteoporosis/stats.htm>. Acesso em: 20 jun.2004
- 58 NELSON, S.; KOLLS, J.K. Alcohol, host defence and society. **Nature Revi**, v.2, p.205-9, Mar. 2002.
- 59 NYQUIST, F. et al. Effects of alcohol on bone mineral and mechanical properties of bone in male rats. **Alcohol Alcoholism**, v.37, n.1, p.21-4, 2002.
- 60 ORLIC, Z.C.; RAISZ, L.G. Causes of secondary osteoporosis. **J Clin Densitomet**, v.2, n.1, p.79-92, 1998.
- 61 PENG, T.C. et al. Ethanol-induce changes in morphology and strength of femurs of rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v.12, n.5, p.655-9, 1988.

- 62 PEPERSACK, T. et al. Longitudinal study of bone metabolism after ethanol withdrawal in alcoholic patients. **J Bone Miner Res**, v.7, n.4, p.383-7, Apr. 1992. (resumo)
- 63 PEREIRA, E.L.A.; SENA, E.P.; OLIVEIRA, I.R. Farmacologia do álcool etílico. Tratamento farmacológico do alcoolismo. In: Silva, P. **Farmacologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.351-7, 2002. Cap.38.
- 64 PREVELIC, G. Osteoporosis in men. **JRSM**, v.94, n.12, p.620 -3, Dec. 2001.
- 65 PYE, S.R. et al. Frequency and causes of osteoporosis in men. **Rheumatol**, v.42, p.811-2, 2003.
- 66 RADOMINSKI, S.C et al. **Osteoporose em mulheres na pós-menopausa**. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, 2002. p.3-16. (Projeto diretrizes).
- 67 RANG, H.P. et al. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Americana, 2004. p.904. Tradução da 5.ed.
- 68 REED, A.H. et al. The effects of chronic alcohol consumption and exercise on the skeleton of adult male rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v.26, n.8, p.1269-74, Aug. 2002.
- 69 RIGGS, B.L.; KHOSLA, S.; MELTON, L. J Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. **Endocrine Rev**, v.23, n.3, p.279-302, June 2002.

- 70 RIZZOLI, R.; BONJOUR, J.P. Determinants of peak bone mass and mechanisms of bone loss. **Osteoporos Int**, v.2 Suppl., p.S17-S23, 1999.
- 71 RUGGIERO, R.J.; LIKIS, F.E. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. **J Midwifery Women's Health**, v.47, n.3, p.130-8, May/June 2002.
- 72 SAMPSON, H.W. Alcohol, osteoporosis, and bone regulating hormones. **Alcohol Clin Exp Res**, v.21, n.3, p.400-3, May 1997.
- 73 SAMPSON, H.W. Alcohol's harmful effects on bone. **Alcohol Health Res World**, v.22, n.3, p.190-4, 1998.
- 74 SAMPSON, H. W. Effects of alcohol consumption on adult and aged bone: a histomorphometric study of the rat animal model. **Alcohol Clin Exp Res**, v.22, n.9, Dec. 1998.
- 75 SAMPSON, H.W. Alcohol and other factors affecting osteoporosis risk in women. **Alcohol Res Health**, v.26, n.4, p.292-8, 2002.
- 76 SAMPSON, H. W.; SHIPLEY, D. Moderate alcohol consumption does not augment bone density in ovariectomized rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v.21, n.7, p.1165, Oct. 1997.
- 77 SAMPSON, H. W.; SPEARS, H. Osteopenia due to chronic alcohol consumption by young actively growing rats is not completely reversible. **Alcohol Clin Exp Res**, v.23, n.2, p.324, Feb. 1999.

- 78 SAMPSON, H.W. et al. Alcohol consumption by young actively growing rats: a histomorphometric study of cancellous bone. **Alcohol Clin Exp Res**, v.21, n.2, p.352-9, Apr. 1997.
- 79 SANTOLARIA, F. et al. Osteopenia assessed by body composition analysis is related to malnutrition in alcoholic patients. **Alcohol**, v.22, p.147-57, 2000.
- 80 SEEMAN, E. The dilemma of osteoporosis in men. **Am J Med**, v.98, n.2A, Suppl., p.2A -76S – 2A -88S, Feb. 1995.
- 81 SILVA, V.A. Ambiente e Desenvolvimento: efeitos do álcool etílico e da desnutrição. **Mundo Vida**, v.2, n.1, p. 21-7,2000.
- 82 SZEJNFELD, V.L. **Osteoporose: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Sarvier, 2000. 406p.
- 83 TEN CATE, R. **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. Cap. 7, p.101-21.
- 84 TIVESTEN, A. et al. Additive protective effects of estrogen and androgen treatment of trabecular bone in ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**, v.19, n.11, p.1833-9, 2004.
- 85 TORTORA, G.J.; GRABOWSKI, S.R. O sistema esquelético: tecido ósseo. In. \_\_\_\_: **Princípios de anatomia e fisiologia**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. Cap. 6, p.145-65.
- 86 TURNER, R. T. Skeletal response to alcohol. **Alcohol Clin Exp Res**, v.24, n.11, p.1693 -701, Nov. 2000.

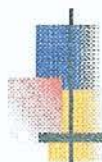
- 87 TURNER, R.T.; SIBONGA, J.D. Effects of alcohol use and estrogen on bone. **Alcohol Res Health**, v.25, n.4, p.276-81, 2001.
- 88 TURNER, R.T. et al. Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. **J Bone Miner Res**, v.16, n.3, p. 589-94, Mar. 2001.
- 89 TURNER, R. T. et al. Effects of parathyroid hormone on bone formation in a rat model for chronic alcohol abuse. **Alcohol Clin Exp Res**, v.25, n.5, p.667-71, May 2001.
- 90 VONDRACEK , S.F.; HANSEN, L.B. Current approaches to the management of osteoporosis in men. **Am J Health Syst Pharm**, v.61, p.1801-11, Sept. 2004.
- 91 WATTS, N.B. Diagnosis and evaluation of patients with osteoporosis. **South Med J**, v.97, n.6, p.540-1, June 2004.
- 92 WHEELER, M. D. Endotoxin and kupffer cell activation in alcoholic liver disease. **Alcohol Res Health**, v.27, n.4, 300-6, 2003.
- 93 WEZEMAN, F.H.; GONG, Z. Bone marrow triglyceride accumulation and hormonal changes during long-term alcohol intake in male and female rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v.25, n.10, p.1515-22, Oct. 2001.
- 94 WEZEMAN, F.H. et al. Spine bone mineral density and vertebral body height are altered by alcohol consumption in growing male and female rats. **Alcohol**, v.31, p.87-92, 2003.

- 95 WILLIAMS, F.M.K. et al. The effect of moderate alcohol consumption on bone mineral density: a study of female twins (consise report). **Ann Rheum Dis**, v. 64, n.2, p.309-10, Feb.2005.
- 96 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Assessment of fracture risk and its applications to screening for postmenopausal osteoporosis**. Geneva: WHO, 1994. (WHO Technical Report Series).
- 97 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on alcohol**. Geneva: WHO, 1999.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia  
de São José dos Campos



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA



Comitê de Ética em Pesquisa-Local

São José dos Campos, 05 de outubro de 2005

Ofício nº 055/05-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	<b>ROSILENE FERNANDES DA ROCHA</b>
Projeto	Influência do consumo crônico de álcool no tecido ósseo de ratos machos e fêmeas
<b>Parecer</b>	
	<p>Foi aprovada a emenda ao projeto acima mencionado, com referência a <b>ALTERAÇÃO DO TÍTULO</b>, passando para <b>INFLUÊNCIA DO CONSUMO CRÔNICO DE ÁLCOOL NO FÊMUR DE RATOS MACHOS E FÊMEAS</b>”.</p> <p>Convalidando dessa forma o Protocolo nº 018/2004-PA/CEP, emitido em 10/08/2004</p>

Sem mais, despedimos atenciosamente,

  
**Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi**  
**Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local**

ROCHA, R.F. **Influence of chronic alcohol consumption on the femur of male and female rats**. 2005. 111f. Tese (Livre-Docência). Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2005.

### ABSTRACT

Considering that alcohol has been identified, in the literature, as an evident risk factor for osteoporosis development, inducing loss of bone mass, the aim of this study was to evaluate the effect of the alcohol on the femur of male and female rats. For this purpose, 35 male and 35 female rats, divided into seven groups of five animals per genera were included. The groups were: control group that received food and water as much as they wished; alcohol group in the concentrations of 10, 20 and 30% and the isocaloric groups corresponding to the concentration of alcohol. After 8 weeks, the animals were sacrificed and evaluated regarding to the body weight and nutritional conditions. Unilateral femurs were removed and analyzed in relation to the length, width, and thickness of the bone cortical, trabeculae percentage and optical density. Data obtained were analyzed by ANOVA (Tukey;  $p < 0.05$ ). Regarding to the weight, loss of weight was observed in the animals of the group alcohol 20% among females and 30% among the males. In relation to the nutritional conditions, the females with the dosages of 10, 20 and 30% of alcohol swallowed a mean of 25, 39 and 53% of Kcal/ and the males 22, 36 and 45 Kcal/day coming from the alcohol. Alcohol reduced the length of the femur only in the group MG6. Mesio-distal width was higher in the group FG6 although the antero-posterior width was not modified. The cortical thickness among males and females was not altered however the percentage of trabeculae bone was reduced among females alcohol 30% and among males with the three alcoholic concentrations. Optical density was reduced in the concentration of 30% among the males and females. Under the experimental conditions, it could be concluded that the effect of alcohol was more evident among the males and in the trabeculae bone, and that the alcoholic concentration of 30% was the most harmful for the bone tissue, probably leading to bone mass reduction and osteopenia.

**KEY WORDS:** Alcoholism; alcohol, osteoporosis, femur, bone formation, osteoblasts, bone trabeculae

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho

São José dos Campos, 02 de dezembro de 2005

---

Rosilene Fernandes da Rocha