

ISABEL CHAVES SILVA CARVALHO

**EFEITO DO ÁLCOOL EM OSTEÓBLASTOS DE RECÉM-
NASCIDOS DE RATAS SUBMETIDAS AO CONSUMO
CRÔNICO DE ETANOL**



2011

ISABEL CHAVES SILVA CARVALHO

**EFEITO DO ÁLCOOL EM OSTEÓBLASTOS DE RECÉM-NASCIDOS DE
RATAS SUBMETIDAS AO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

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

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

C253e Carvalho, Isabel Chaves Silva.
Efeito do álcool em osteoblastos de recém-nascidos de ratas submetidas ao
consumo crônico de etanol / Isabel Chaves Silva Carvalho. __ São José dos
Campos : [s.n.], 2011
84 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia
de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.
Orientador: Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Luana Marotta Reis de Vasconcellos

1. Álcool etílico. 2. Gestação. 3. Técnicas de cultura celular. 4. Osteoblastos.
5. Adesão celular. 6. Proliferação celular. 7. Fosfatase alcalina. 8.
Mineralização. I. Rocha, Rosilene Fernandes da. II. Universidade Estadual
Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD64

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio
convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 28 de abril de 2011.

Assinatura :

E-mail: isabel_chaves@zipmail.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Luana Marotta Reis de Vasconcellos (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

Profª. Drª. Cristina Pacheco Soares

Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP

Profª. Drª. Luciane Dias de Oliveira

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ Estadual Paulista

São José dos Campos, 21 de julho de 2011.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Aldo, obrigada por acreditar sempre nos meus sonhos e me incentivar, com muito amor e paciência, a prosseguir.

Te amo e admiro cada vez mais!

Aos meus pais Maria José e José Benedito, pelo amor, dedicação e esforço imensuráveis para que eu e minha irmã pudéssemos alcançar nossos objetivos. Vocês me ensinaram a batalhar pelos meus ideais, faço desta, a realização de vocês. Amo vocês!

À minha querida irmã Ana Celsoisa, muito obrigada pelo apoio, carinho e amizade. Estaremos sempre juntas, te amo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A DEUS pela graça de realizar mais um sonho

À minha querida orientadora, Prof^a. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha ou simplesmente Prof^a. Rose. Muito obrigada pelo exemplo, pelo voto de confiança, pelos ensinamentos, pelo constante apoio, pela amizade e carinho.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Luana Marotta Reis de Vasconcellos, pelos ensinamentos, pela atenção, pelo incentivo e amizade.

Ao Prof. Assoc. Paulo Tambasco de Oliveira e ao técnico Roger Rodrigo Fernandes da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelos conhecimentos transmitidos, paciência, disponibilidade e amizade.

À amiga Dennia Perez de Andrade, agradeço pela parceria e carinho na realização deste trabalho, por compartilhar os problemas e comemorar cada etapa vencida. Foi um grande prazer trabalhar com você, espero, sinceramente, que continuemos nossa parceria ao longo de nossas vidas.

À amiga Evelyn Luzia de Souza Santos pelo empenho na realização deste trabalho, pela ajuda constante e pela amizade dedicada. Foi um grande prazer trabalhar com você!

AGRADECIMENTOS

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio financeiro.

À Prof^a. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho, pelo auxílio durante a realização do trabalho, pela sua atenção e amizade.

Às Prof^a. Dr^a. Luciane Dias de Oliveira e Prof^a. Dr^a. Samira Esteves Afonso Camargo, pelas valiosas sugestões, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, por ceder as instalações do Laboratório de Cultura de Células para a realização da pesquisa.

A todos os docentes de Pós-graduação pelo convívio e oportunidade de aprendizagem.

Aos secretários da Pós-graduação e às funcionárias da biblioteca da FOSJC pela prontidão em nos atender sempre.

Aos funcionários do biotério, Sr. Toninho e Marco pela amizade e pela colaboração.

Ao técnico Sérgio pela colaboração nas etapas laboratoriais.

A todos os colegas Pós-graduandos, em especial Daniel de Oliveira Leite e Érika Cristina Sbrisse Pereira pela amizade e colaboração.

À minha nova família, representada pelos meus sogros Maria Nazareth de Freitas Carvalho e Antônio de Carvalho Sobrinho. Obrigada pela torcida.

Meu respeito aos animais sacrificados durante os experimentos.

Enfim, agradeço a todos, que direta ou indiretamente, participaram desta etapa de minha vida.

O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Consumo do álcool	13
2.2 Metabolismo do álcool	15
2.3 Efeitos do álcool na dieta	18
2.4 Tecido ósseo e efeitos do álcool	20
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODO	30
4.1 Animais	30
4.1.1 Gestação	30
4.1.2 Grupos experimentais	31
4.1.3 Eutanásia dos animais	32
4.2 Procedimentos de cultura celular	33
4.2.1 Isolamento de células da linhagem osteoblástica e desenvolvimento de cultura primária osteogênica	33
4.2.2 Adesão celular	36
4.2.3 Proliferação celular	37
4.2.4 Determinação da viabilidade celular	37
4.2.5 Conteúdo de proteína total	39
4.2.6 Atividade da fosfatase alcalina	41
4.2.7 Quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada	43
4.3 Método de análise dos resultados	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Adesão celular	46

5.2 Proliferação celular.....	48
5.3 Viabilidade celular.....	51
5.4 Conteúdo de proteína total.....	54
5.5 Atividade da fosfatase alcalina.....	57
5.6 Quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada.....	60
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÃO.....	72
8 REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO.....	84

Carvalho I.C.S. Efeito do álcool em osteoblastos de recém-nascidos de ratas submetidas ao consumo crônico de etanol [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

O álcool atua no organismo podendo trazer várias doenças, entretanto sua ação no tecido ósseo ainda apresenta resultados controversos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do consumo crônico de álcool a 20% em osteoblastos obtidos da calvária de ratos recém-nascidos. Foram utilizadas 18 ratas prenhas, tratadas durante a gestação e divididas em grupos conforme a dieta: álcool a 20%, grupo isocalórico, e controle. Aos três dias de vida, os recém-nascidos foram eutanasiados para remoção da calvária e isolamento das células por meio de digestão enzimática sequencial, sendo estas cultivadas por períodos de até 14 dias. Foram realizados testes para avaliar o efeito do álcool na adesão, proliferação e viabilidade celular, no conteúdo de proteína total, na atividade da fosfatase alcalina e nas formações nodulares de matriz mineralizada. Os resultados mostraram que em geral, a adesão celular não foi influenciada pelo consumo crônico de álcool, já que não foi demonstrada diferença estatística entre os grupos. Contudo, o grupo álcool apresentou aumento significativo na proliferação, exceto no período de 1 dia, e nas formações nodulares. Com relação a viabilidade celular, apenas no período de 3 dias houve aumento significativo de células no grupo álcool. Os valores representativos de proteína total variaram dependendo do período estudado, sendo maior no grupo controle com 7 dias, porém aos 14 dias houve maior média nos grupos isocalórico e álcool. Quanto à fosfatase alcalina observamos aumento de sua atividade nos grupos álcool e isocalórico em todos os períodos. Concluímos que nesta metodologia, o álcool não apresentou efeito deletério para os osteoblastos, talvez pelo curto tempo de administração.

Palavras-chave: Álcool etílico. Gestação. Técnicas de cultura celular. Osteoblastos. Adesão celular. Proliferação celular. Fosfatase alcalina. Mineralização.

Carvalho I.C.S. *The effect of alcohol on rat newborns osteoblasts submitted to ethanol chronic consumption [dissertation].* São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

The alcohol affects the organism and may cause various diseases, even though its effects on bone metabolism are still controversial. The purpose of this paper was to evaluate the effects of alcohol 20% chronic consumption in osteoblasts obtained from the calvaria of newborn mice. The alcohol was administrated to pregnant mice throughout the entire pregnancy. For that purpose, 18 mice were used, divided in groups according to the diet: 6 receiving alcohol 20%, 6 belonging to the isocaloric group and 6 receiving water and ration at will. At three days of life, the newborns were euthanized so as to remove the calvaria and start the cell culture procedures. The osteoblastic lineage cells were isolated by sequential enzymatic digestion and the osteoblasts were cultivated for periods of 14 days or less. Tests were performed on the culture slides to evaluate the effect of alcohol based on adhesion, proliferation and cellular viability on total protein content, alkaline phosphatase activity and nodule formation of mineralized matrix. The results have shown that the alcohol group presented significant increase in proliferation, except for the period of one day, and in nodule formation. A significant increase in the alcohol group concerning cellular viability was only observed in the period of 3 days and there was no statistic difference in adhesion. The total protein content was higher in the control group in 7 days, and the average higher in the isocaloric and alcohol groups in 14 days, according to the periods of time studied. An increase in the activity of the alkaline phosphatase was observed in the isocaloric and alcohol groups in all periods of evaluation. By this methodology, we have concluded that the alcohol has not presented any deleterious effect on osteoblasts, possibly due to the short period of administration.

Keywords: Ethyl alcohol. Gestation. Cell culture techniques. Osteoblasts. Cell adhesion. Cell proliferation. Alkaline phosphatase. Mineralization.

1 INTRODUÇÃO

A grande aceitação social do álcool leva a falsa crença de inocência do seu uso, mas o consumo excessivo tem sido um dos grandes problemas de saúde das sociedades modernas.

O uso abusivo, além de estar relacionado a várias patologias afeta também os ossos, podendo levar à fraturas ósseas, osteopenia e osteoporose. Além disso, temos como consequência do consumo de álcool os problemas sociais, pois o seu uso está associado a acidentes graves e fatais de trânsito, homicídios, suicídios e outros comportamentos violentos.

O consumo durante a gestação pode causar problemas ao feto, uma vez que o álcool também possui efeito teratogênico. Um dos efeitos que o consumo crônico de etanol pode causar ao feto é prejudicar seu desenvolvimento ósseo.

O álcool atua no metabolismo ósseo por ação indireta através da modulação de hormônios envolvidos no metabolismo ósseo, desenvolvimento de doenças hepáticas e desnutrição e por ação direta causando um efeito antiproliferativo nos osteoblastos. Os osteoblastos e osteoclastos são as células responsáveis pelo mecanismo de remodelação óssea, portanto torna-se essencial um equilíbrio entre essas células para que não ocorra perda de massa óssea.

Considerando o elevado consumo de álcool, os efeitos deletérios no tecido ósseo, o problema do consumo durante a gestação, a ação antiproliferativa sobre os osteoblastos e a ausência de trabalhos na literatura consultada que avaliem os efeitos do consumo do álcool durante a gestação nos osteoblastos dos recém-nascidos, justifica-se assim, a realização deste trabalho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Consumo do álcool

O alcoolismo, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é uma doença severa, crônica e degenerativa, sendo de difícil tratamento e associada a violentas causas de mortes (WHO, 1999).

O artigo “Alcoholismus Chronicus” do médico sueco Magnus Huss em 1849 foi a primeira descrição sobre a definição e os critérios que determinam a dependência ao consumo de álcool. Desde então esses critérios vem sendo modificados (Gigliotti, Bessa, 2004) e atualmente o diagnóstico mais aceito é baseado na classificação internacional de doenças (CID-10 – 1997) da OMS e no manual de diagnóstico e estatístico dos distúrbios mentais da *American Psychiatric Association* (DSM-IV – 1994).

Segundo o primeiro levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool etílico na população do Brasil, 52% dos brasileiros podem ser considerados bebedores, sendo que 27% faz uso ocasional ou raro e 25% faz uso com frequência no mínimo semanal. Isso nos mostra como as bebidas alcoólicas, embora consideradas uma droga, apresentam grande aceitação social. Seu consumo é um comportamento adaptado à maioria das culturas e atinge tanto homens como mulheres, apesar de ser mais frequente nos homens (Laranjeira et al.,2007).

O consumo de álcool está associado a acidentes graves e fatais de trânsito, a homicídios, a suicídios e uma ampla gama de comportamentos violentos. Dados especulativos estimam que o Brasil gaste, anualmente, 7,3% do Produto Interno Bruto (PIB) com

consequências de problemas relacionados ao álcool – desde o tratamento das condições médicas até a perda da produtividade decorrentes do seu uso (Gallassi et al., 2008; Ponce et al., 2008). Logo se verifica que o álcool, certamente, contribui para etiologia e manutenção de vários problemas sociais, econômicos e de saúde enfrentados no Brasil (Galduróz, Caetano, 2004) e seu uso exagerado pode originar um grave transtorno de saúde pública mundial (Gigliotti, Bessa, 2004).

De acordo com o relatório publicado pela OMS, cerca de 1,8 milhões de mortes por ano são causadas pelo consumo de álcool e estima-se que de 10% a 18% dos casos atendidos em emergências hospitalares estejam relacionados ao consumo excessivo da substância (WHO, 2007).

Os limites de uso do etanol são definidos pela dose, que é determinada por cada país, variando de 8 g de etanol absoluto no Reino Unido a 19,75 g no Japão (Alves et al., 2003). No Brasil, segundo a Associação Brasileira de Medicina de Tráfego (2008), 12 g de etanol correspondem a uma dose e deve ser relacionada com as bebidas alcoólicas de consumo comum.

Legalmente, o consumo de bebidas alcoólicas no Brasil é permitido para maiores de 18 anos de idade, mas não há efetividade no cumprimento desta lei. Portanto, muitos indivíduos desde a adolescência abusam do consumo de álcool e esse abuso se torna um forte fator desencadeante de alcoolismo na idade adulta (Laranjeira et al., 2007).

A nova regulamentação do código de trânsito brasileiro dita que a capacidade de desempenhar funções cruciais para a condução de veículos encontra-se reduzida com alcoolemia acima de 0,5 g/L, portanto o limite máximo de alcoolemia no sangue para uma pessoa ser considerada não alcoolizada é de 0,2 g/L (Associação Brasileira de Medicina de Tráfego, 2008; Brasil, 2008).

2.2 Metabolismo do álcool

Imediatamente, após sua ingestão, inicia-se a absorção do etanol pela mucosa bucal e alvéolos pulmonares em pequena quantidade. Em seguida, cerca de 20% é absorvido no estômago e o restante no intestino delgado pelo processo de difusão simples. Depois de passar pelo trato gastrointestinal alcança a circulação sistêmica e por ser uma molécula hidrossolúvel solubiliza-se no plasma e distribui-se pela massa magra do corpo, cérebro, músculos e fígado (Brienza, Stein, 2002; Paton, 2005; Gemma et al., 2006; Fleming et al., 2010).

Essa farmacocinética marca a diferença entre os efeitos do álcool entre homens e mulheres, uma vez que o volume de distribuição é menor nas mulheres que nos homens. Além disso, as mulheres possuem mais gordura e menor massa corpórea magra que os homens, levando a concentrações sanguíneas mais elevadas que nos homens para a mesma quantidade de álcool ingerida. No entanto a concentração alcoólica que chega ao sangue é influenciada por fatores ambientais como: a quantidade de etanol consumida em determinado tempo, a quantidade de alimento no estômago, o tipo de bebida alcoólica consumida, e de fatores genéticos como: a variação nas principais enzimas responsáveis pela metabolização do etanol, a álcool desidrogenase e a aldeído desidrogenase, além de outros fatores como a massa corporal (Brienza, Stein, 2002; Paton, 2005; Gemma et al., 2006; Zakhari, 2006; Fleming et al., 2010).

Após a absorção do etanol cerca de 90% dessas moléculas são metabolizadas no fígado e uma pequena porção é eliminada de forma inalterada pelos pulmões, rins, suor e saliva (Paton, 2005; Gifford et al., 2008). O metabolismo dessa molécula envolve três vias, a via da enzima álcool desidrogenase, a via do sistema microssomal

de oxidase de função mista e a via da catalase (Lieber, 2003; Lieber, 2004; Lieber, 2005; Fleming et al., 2010).

A principal e mais usual via de biotransformação ocorre no citosol de células gástricas e nos hepatócitos, onde a molécula de etanol é convertida em acetaldeído pela ação da enzima álcool desidrogenase (ADH). Essa reação utiliza o nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (NAD^+) como receptor de hidrogênio e produz o nicotinamida-dinucleotídeo reduzido (NADH). O acetaldeído formado é convertido em acetato por uma segunda enzima mitocondrial, a aldeído-desidrogenase (ALDH), que também utiliza como coenzima o NAD^+ que é reduzido em NADH, o acetato é rapidamente convertido em água e dióxido de carbono (Mezey, 1980; Lieber, 2001; Paton, 2005; Gemma et al., 2006; Zakhari, 2006).

O acetaldeído é um produto tóxico do etanol e altamente prejudicial ao sistema nervoso central, tem atividade mutagênica e carcinogênica (Zakhari, 2006; Seitz, Becker, 2007) e causa também vasodilatação dos capilares cutâneos levando o indivíduo ao rubor e a perda de calor (Fleming et al., 2010). Além disso, pode contribuir para a hepatotoxicidade, hiperlipidemia, hipoglicemia, esteatose e gastrite (Lieber, 2003; Lieber, 2005).

O segundo mecanismo de biotransformação do álcool segue a via do sistema microssomal de oxidação do álcool (MEOS) e ocorre no retículo endoplasmático dos hepatócitos através do complexo enzimático citocromo P450. Esse mecanismo é acionado geralmente em alcoolistas quando é consumida grande quantidade de etanol e o sistema da ADH está saturado, dessa forma cerca de 10% de moléculas de etanol que estão no fígado são metabolizadas por essa via. Nesse mecanismo o álcool também é convertido em acetaldeído, oxidando NADPH em NADP^+ . Existe ainda uma terceira via de metabolização do etanol, na qual uma pequena quantidade de moléculas é metabolizada no interior dos peroxissomas sob ação da enzima catalase (Lieber, 2003; Paton, 2005; Gemma et al., 2006; Zakhari, 2006; Lu, Cederbaum, 2008).

Segundo Fleming et al. (2010) a metabolização do etanol ocorre em velocidade constante e independe das suas concentrações séricas. Em média, um indivíduo oxida cerca de 10 mL/h, que corresponde a 7,9 g, sendo que a maior parte é oxidada e que 2% a 10% são eliminados na forma inalterada. Em ratos a saturação desta biotransformação é de aproximadamente 700 mg/kg/h e o tempo de meia-vida após a administração intravenosa de 250 mg/Kg nestes animais é de 30 minutos (Gifford et al., 2008).

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

A velocidade de biotransformação e o tempo em que os metabólitos tóxicos ficam circulantes é que determinam os principais danos celulares, pois quanto maior a deficiência nas enzimas catalisadoras, maior o risco do álcool e do acetaldeído ficarem circulantes e agirem de maneira tóxica sobre os órgãos. Todavia, indivíduos que possuem esse polimorfismo tendem a ingerir menos bebidas alcoólicas, porque o aumento do acetaldeído promove várias reações desagradáveis como rubor facial, vasodilatação periférica, confusão mental, náusea, cefaléia pulsante e taquicardia (Edenberg, 2007).

O polimorfismo genético para biotransformação de etanol pode ser observado em alguns grupos étnicos para deficiência metabólica, que reduz o risco de dependência como nos asiáticos (Strat et al., 2008) e para maior eficiência nos afro-americanos (Scott, Taylor,

2007), que têm maiores índices de dependência ao etanol (Gemma et al., 2006; Sloan et al., 2008). Em comparações entre sexo, as mulheres são mais sensíveis aos efeitos do etanol pela menor concentração da enzima álcool desidrogenase ou pela diferença na composição bioquímica do organismo (Sampson, 1997; Seitz, Becker, 2007).

2.3 Efeitos do álcool na dieta

O álcool, chamado quimicamente de etanol ou álcool etílico, é uma fonte de energia diferente, pois não pode ser estocado já que é uma substância tóxica. Logo, sua eliminação tem que ser imediata e por isso tem prioridade no metabolismo, alterando outras vias metabólicas, incluindo a oxidação lipídica, o que favorece o estoque de gorduras que se depositam preferencialmente na área abdominal (Kachani et al., 2008).

O etanol fornece 7,1 Kcal/g, o que o faz ser considerado um nutriente considerável, comparando-se aos carboidratos (4 Kcal/g), proteínas (4 Kcal/g) e lipídios (9 kcal/g) (Lieber, 2003; Otero; Cortés, 2008; Tujague; Kerr, 2009). Sabe-se que o álcool supre o alimento na dieta de alcoolistas, no entanto, essas calorias são ditas vazias, ou seja, não estão relacionadas com ingestão de proteínas, sais minerais ou vitaminas, levando esses indivíduos a desnutrição (Lieber, 2003; Kachani et al., 2008).

A desnutrição primária ocorre quando o álcool substitui outros nutrientes na dieta através dos hábitos alimentares irregulares e pela perda na qualidade da dieta, agravada pela alta concentração energética presente nas bebidas alcoólicas não acompanhadas de vitaminas e sais minerais (Lieber, 2003; Otero, Cortés, 2008; Tujague, Kerr, 2009). A desnutrição secundária ocorre quando os alcoolistas

consomem nutrientes adequados, mas o etanol interfere na absorção dos nutrientes através das complicações gastrointestinais como a redução da absorção, insuficiência hepática, deficiência enzimática e quebra da barreira intestinal, aumentando o número de bactérias no intestino e enfraquecendo a defesa imunológica (Lieber, 2003; Otero, Cortés, 2008).

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

A redução na absorção de vitaminas e minerais causa uma baixa biodisponibilidade destes nutrientes, e isso altera todo estado nutricional de um indivíduo, podendo também levar a desordens ósseas. O cálcio é obtido somente através da dieta e é o quinto elemento mineral mais encontrado no organismo, em condições normais, somente 1% do cálcio encontra-se no meio extracelular e nos tecidos moles e os 99% restante estão presentes no esqueleto e dentes, na forma de hidroxiapatita (Ilich, Kerstetter, 2000; Nelson, Cox, 2004; Heaney, 2006; Talmage, Talmage, 2006; Moe, 2008).

Em 2008, Berg et al. publicaram uma revisão sistemática da literatura e observaram que indivíduos que consumiam até uma dose de bebida por dia apresentaram menor risco de fratura da bacia, comparados com indivíduos que não consumiam bebidas alcoólicas. Porém, indivíduos que consumiam mais de duas doses ao dia tinham esse risco de fratura aumentado, isso sugere que o consumo crônico moderado de etanol seria benéfico ao tecido ósseo, enquanto que o consumo exagerado é responsável pelos malefícios. Entretanto, os autores advertem que essa literatura é insuficiente para definir uma média de consumo de álcool segura e capaz de minimizar o risco de fratura.

Micaleff et al. (2007) estudaram quarenta voluntários de adultos jovens e idosos que consumiram 400 mL de vinho tinto por dia durante duas semanas e verificaram que houve aumento significativo da concentração sérica de antioxidantes nos indivíduos voluntários, o que sugere uma potente propriedade antioxidante fornecida pelo consumo de vinho tinto e uma potencial proteção no desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Um dos antioxidantes mais promissores em pesquisa com o consumo de vinho é o resveratrol e este também tem sido utilizado em pesquisas de processos oxidativos patológicos relacionados ao mau funcionamento mitocondrial (Shin et al., 2009). Contudo, sabe-se que a ingestão de álcool em longo prazo e altas doses promove alterações fisiológicas (Bagnardi et al., 2001), comportamentais (Laranjeira, Romano, 2004), neurológicas (Cunha, Novaes, 2004) e nutricionais severas (Lieber, 2003).

2.4 Tecido ósseo e efeitos do álcool

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto, que tem três funções básicas, são elas, função mecânica, sustenta o corpo e é o local onde se inserem os músculos, função protetora, protege os órgãos vitais como vísceras e medula óssea e a função metabólica, pois é o maior reservatório de íons cálcio, fosfato e magnésio, que são necessários para manutenção da homeostasia mineral. O esqueleto em desenvolvimento tem sua atividade voltada para o crescimento e a modelação óssea, processos que são responsáveis pela forma e tamanho do osso e no esqueleto adulto o crescimento e a modelação são reservados para reparar fraturas e microfraturas, logo a atividade

metabólica normal do esqueleto adulto é predominantemente a remodelação óssea (Szejnfeld, 2000; Junqueira, Carneiro, 2009).

Estruturalmente o tecido ósseo é dividido em dois tipos, o cortical e o trabecular, eles são formados pelos mesmos tipos celulares e componentes intercelulares. Entretanto, o osso cortical representa cerca de 80% de toda massa óssea esquelética, é formado por camadas densas calcificadas e constitui as corticais dos ossos longos e é encontrado, também, na camada externa de todos os ossos (Szejnfeld, 2000).

O osso trabecular tem uma porosidade característica, logo a disposição espacial de seus componentes é diferente do osso cortical. Nesse tipo de arranjo ósseo os espaços medulares são maiores e dispostos de forma irregular. Além disso, o osso trabecular é preenchido por medula óssea, que também está presente na diáfise dos ossos longos (Szejnfeld, 2000; Junqueira, Carneiro, 2009).

Além dessa matriz óssea calcificada o tecido ósseo também é formado por células. As células presentes são os osteócitos, localizados em cavidades ou lacunas no interior da matriz; os osteoblastos, que produzem a parte orgânica da matriz e os osteoclastos, células gigantes, móveis e multinucleadas, que participam do processo de remodelação reabsorvendo o tecido ósseo. As superfícies ósseas são revestidas por membranas conjuntivas que contêm células osteogênicas, a membrana externa é chamada perióstio e a interna endóstio. A função das células presentes nessas membranas é nutrir o tecido ósseo e fornecer novos osteoblastos para o crescimento e a renovação do osso (Szejnfeld, 2000; Junqueira, Carneiro, 2009).

O osso apesar de ser um tecido rígido está em constante remodelação e justamente por isso torna-se sensível às mudanças nas suas atividades celulares. No processo de remodelação os osteoblastos e osteoclastos trabalham acoplados com o objetivo de substituir o tecido senil, reorganizar o arranjo celular, manter a homeostasia mineral e

adaptar a microarquitetura óssea às forças biomecânicas, logo um desequilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea pode levar ao aparecimento de doenças (Szejnfeld, 2000; Hazenberg et al., 2007; Henriksen et al., 2007).

A osteoporose, uma desordem esquelética caracterizada pelo comprometimento da resistência óssea predispondo a um aumento do risco de fratura, pode ser classificada em dois tipos principais, a forma primária ou idiopática e a secundária. A forma primária é classificada em tipo I e II, no tipo I existe rápida perda óssea, ocorre na mulher menopausada e atinge predominantemente o osso trabecular e a tipo II está relacionada ao envelhecimento e aparece por deficiência crônica de cálcio, aumento da atividade do paratormônio e diminuição da formação óssea (Sampson, 2002; Gali, 2001). Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da osteoporose secundária destaca-se o alcoolismo (Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy, 2000; Lane, 2006; Metcalfe, 2008).

O consumo crônico excessivo de álcool pode resultar em osteopenia e aumentar o risco de osteoporose. Esse hábito não apenas aumenta a incidência de fraturas provenientes de quedas, como atrasa a cura da fratura. A osteopenia induzida por álcool resulta principalmente da diminuição da formação óssea, ao contrário do que ocorre na osteoporose induzida por deficiência estrogênica, em que se tem principalmente um aumento da reabsorção óssea. O consumo crônico de álcool parece afetar a atividade osteoblástica, suprimindo sua diferenciação na medula óssea e promovendo adipogênese. Na cura da fratura, o efeito do álcool é suprimir a síntese de matriz óssea, possivelmente devido à inibição da proliferação e diferenciação das células mesenquimais no reparo ósseo. O reparo ósseo deficiente resulta em pouca resistência, dureza e conteúdo mineral (Chakkalakal, 2005).

Os efeitos diretos do álcool sobre as células responsáveis pela remodelação óssea, e conseqüente osteopenia, implicam em um

déficit da deposição óssea dependente de osteoblasto e/ou por um excesso de reabsorção óssea dependente de osteoclasto. Isso foi evidenciado por Daí et al. (2000) quando compararam a diferença das células de medula de camundongos normais e de camundongos deficientes em IL-6, indutora de osteoclastogênese, e quantificaram a densidade óssea mineral e a resposta da cultura celular de fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos e células da medula óssea para IL-6, estradiol, testosterona e etanol. Os autores observaram que o etanol aumentou a expressão do RNAm de fator KB, receptor e ativador para osteoclastos (RANKL), nas células da medula óssea de animais IL-6 positivos, mas não nos animais com essa deficiência. Além disso, o etanol alterou negativamente as características dos osteoblastos como morfologia e habilidade para a retenção de cálcio em ambos os animais e as culturas deficientes em IL-6 foram incapazes de acumular precursores de osteoclastos em resposta ao etanol.

Hogan et al. (2001) avaliaram o efeito do álcool em ratas de 9 meses de idade após o consumo de álcool durante os períodos de 8 e 14 semanas. Os animais foram divididos em: grupo álcool (que recebeu solução de etanol a 8,1%), grupo isocalórico e grupo controle. Os autores observaram que a cortical óssea da região proximal da tíbia estava mais delgada nos animais que receberam álcool, sendo que esse adelgaçamento foi mais expressivo no grupo que recebeu álcool por 14 semanas. O número e volume das trabéculas ósseas também foram menores no grupo álcool, estando também associado ao tempo de dieta. Os autores observaram também redução de 81% nas propriedades mecânicas da região distal da tíbia do grupo álcool de 14 semanas, já a região de diáfise deste osso não apresentou diferença. Os autores concluíram que o consumo de álcool leva a redução das propriedades mecânicas ósseas e também do volume e número de trabéculas, sendo que a duração da dieta tem grande importância na intensidade do efeito.

Chakkalakal et al. (2002) estudaram o efeito do consumo do álcool no reparo ósseo. Eles utilizaram ratos com idade entre 8 e 10 semanas e os dividiram em 4 grupos: o grupo álcool recebeu 36% das calorias em etanol; o segundo grupo recebeu dieta isocalórica ao grupo álcool, com as calorias do álcool substituídas por maltodextrina; o grupo controle e o último grupo recebeu a mesma dieta do grupo álcool até o momento em que foi feita a lesão e depois recebeu dieta isocalórica. Após 6 semanas do início da dieta, foi feita lesão óssea nas fíbulas dos animais e após 7 semanas os animais foram eutanasiados. As fíbulas foram removidas e foi feita avaliação do reparo ósseo. Quando as fíbulas foram seccionadas no local da lesão, a área em que o reparo ainda não estava completo, no grupo álcool, foi 30% maior que no grupo isocalórico e 28% maior que no grupo que recebeu dieta alcóolica e isocalórica. O grupo tratado com maltodextrina foi 14% menor que o grupo controle. Os autores concluíram que os animais que ingeriram álcool apresentaram reparo ósseo deficiente quando comparados ao que não ingeriram.

O consumo crônico de etanol atua no metabolismo ósseo por ação indireta e direta. A ação indireta ocorre, principalmente, pela modulação de hormônios envolvidos no metabolismo ósseo (Sampson, 1997; Turner, 2000), desenvolvimento de doenças hepáticas e desnutrição (Lieber, 2000). Diretamente o álcool tem um efeito antiproliferativo sobre os osteoblastos (Klein et al., 1996; Dyer et al., 1998).

Friday e Howard (1991) estudaram, *in vitro*, os efeitos do etanol na proliferação e função de osteoblastos humanos. Para tanto os autores isolaram osteoblastos de fragmentos de osso trabecular de pacientes com doença articular degenerativa submetidos à substituição total de quadril ou joelho e cultivaram as células em diferentes concentrações de álcool. Os autores observaram que o etanol tem efeito inibitório dose-dependente na proliferação e síntese protéica de células ósseas humanas e concluíram que estes resultados sugerem que o

mecanismo que contribui para osteopenia e fraturas ósseas no alcoolismo pode ser o efeito tóxico direto do etanol sobre os osteoblastos e que o etanol não deve ser usado como veículo para outras substâncias em pesquisas com células ósseas já que ele não se mostrou um agente inócuo mesmo em baixas concentrações.

Chavassieux et al. (1993) também avaliaram, *in vitro*, a relação de dose-efeito do etanol em células osteoblásticas humanas. Os autores concluíram que existe uma relação direta entre o aumento da dose e o efeito do etanol diminuindo a atividade da fosfatase alcalina, a secreção de osteocalcina e a proliferação dos osteoblastos.

Klein et al. (1996) avaliaram o efeito do etanol em uma linhagem de células osteoblásticas de osteossarcoma humano (TE- 85) sobre os parâmetros de crescimento celular e da atividade de poliaminas e ornitina descarboxilase, enzima limitante para a síntese de poliaminas que são essenciais para a proliferação de vários tipos celulares. Os autores concluíram que o etanol prejudicou a síntese de DNA e a proliferação celular de forma dose-dependente, mas a atividade de fosfatase alcalina manteve-se intacta, e a apoptose acelerada não era evidente. Assim, o número de células reduzido foi resultado de um efeito direto sobre o processo de proliferação e não um efeito tóxico inespecífico do etanol para acelerar a morte celular. A indução da atividade da ornitina descarboxilase foi prejudicada em culturas de células expostas ao etanol de uma forma dose-dependente que acompanhou os efeitos antiproliferativos e a administração suplementar de poliaminas melhorou substancialmente a síntese de DNA. Estes dados confirmam um efeito inibitório direto do etanol sobre a proliferação dos osteoblastos, sem toxicidade celular evidente que pode, em parte, explicar a redução da massa óssea observada em pessoas que consomem quantidades excessivas de álcool.

Para entender melhor os efeitos do consumo de álcool no processo de remodelação *in vivo* Dyer et al. (1998) usaram tíbias de ratas

para comparar a atividade e o número de osteoblastos em animais tratados com álcool 35%, animais tratados com solução isocalórica à solução alcóolica e animais controle. As ratas foram submetidas ao tratamento por 6 semanas. O presente estudo relata que os animais tratados com álcool tiveram uma redução no volume de osso trabecular, no número de trabéculas e na espessura das trabéculas ósseas em relação ao grupo controle. O número de osteoblastos ativos presentes na superfície trabecular também foi menor, o que implica na redução da proliferação dos osteoblastos e na espessura da cortical, indicando que a atividade de osteoblastos foi reduzida.

Torricelli et al. (2007) avaliaram, *in vitro*, o efeito do consumo de álcool e da deficiência estrogênica na atividade dos osteoblastos. Os autores isolaram e cultivaram osteoblastos de ratas divididas em: expostas ao vapor de etanol durante 7 semanas; com deficiência estrogênica provocada por ovariectomia; e controle. Os autores observaram que a taxa de proliferação osteoblástica, assim como a capacidade sintética dos osteoblastos foram significativamente mais afetadas pelo álcool que pela deficiência estrogênica. Isso levou os autores a concluir que o hábito de consumir bebidas alcólicas pode ser mais deletério para o osso que a deficiência de estrogênio.

Em 2008, Torricelli et al. avaliaram, *in vitro*, os efeitos do álcool em osteoblastos. Para tanto, os autores expuseram ratos ao vapor de etanol durante 7 semanas de forma intermitente e depois isolaram osteoblastos de seu osso trabecular e cultivaram em titânio comercialmente puro. Todos os resultados mostraram um declínio na viabilidade celular e atividade sintética dos osteoblastos expostos ao etanol, sugerindo que o abuso do álcool afeta a reparação óssea e reduz a capacidade de formar osso nas amostras padrão.

Rosa et al. (2008) investigaram se o consumo crônico de etanol e a exposição posterior do osteoblasto ao álcool afetaria a diferenciação osteoblástica, avaliando parâmetros-chaves da

osteogênese in vitro. Para tanto, os ratos foram tratados com 5 a 20% de etanol, com um aumento de 5% por semana por um período de quatro semanas para habituação dos animais. Depois o nível de 20% foi mantido durante 15 dias para simular o consumo crônico. As células-tronco do grupo controle (CONT) ou grupo dos animais tratados com etanol (ETH) foram cultivadas em meio osteogênico que foi (ETH) ou não (CONT) suplementado com 1,3 mM etanol. Assim, quatro grupos relacionados com o tratamento do animal / suplementação do meio de cultura foram avaliados: (1) CONT / CONT, (2) ETH / CONT, (3) CONT / ETH e (4) ETH / ETH. Nos resultados não foi observada diferença na morfologia entre os tratamentos. O número de células foi afetada nos dias 7 e 10 do seguinte modo: CONT / CONT = CONT / ETH < ETH / CONT = ETH / ETH. O tempo de duplicação entre 3 e 10 dias foi maior nos grupos de animais CONT: ETH / ETH = ETH / CONT < CONT / ETH = CONT / CONT. A viabilidade celular e a atividade de fosfatase alcalina não foram afetadas por um ou outro tratamento de animais ou a exposição da cultura para etanol. Em 21 dias, o teor de proteína total foi afetado da seguinte forma: ETH / ETH = CONT / ETH < ETH / CONT = CONT / CONT. A formação de nódulos foi afetada da seguinte forma: ETH / ETH < CONT / ETH < ETH / CONT < CONT / CONT. Estes resultados mostram que a ingestão crônica de álcool, seguido pela exposição ao etanol de osteoblastos, inibe a diferenciação dos osteoblastos, como indicado por uma taxa de aumento da proliferação e pela redução da formação dos nódulos de mineralização.

O etanol também tem efeito teratogênico, a Síndrome Fetal Alcoólica (SFA) é uma das graves consequências que a exposição ao álcool durante a gestação pode causar. Esta síndrome está associada a um conjunto de distúrbios físicos, crescimento intra-uterino atrasado e deficiência intelectual pós-natal (Rifas et al., 1997; Long et al., 2010).

Outro efeito do consumo crônico de etanol durante a gestação está presente no desenvolvimento ósseo. Baseados nisso

Ramadoss et al., 2006 estudaram o efeito do consumo exagerado de álcool durante toda a gestação em ovinos avaliando a força e crescimento dos ossos dos fetos e das mães e verificaram que os ossos da mãe não sofreram alteração, mas as altas doses de álcool resultaram na diminuição da força do fêmur dos fetos e as menores doses de álcool aumentaram a força do fêmur dos fetos quando comparados ao grupo que não recebeu álcool durante a gestação. Além disso os ossos dos fetos expostos ao álcool também tenderam a apresentar comprimentos reduzidos, e concluíram que os efeitos da exposição ao álcool durante a gestação são dose-depende.

Diante do elevado consumo de álcool, dos efeitos deletérios causados pelo consumo do álcool no tecido ósseo das pessoas que o consomem, do problema do consumo de álcool durante a gestação e suas consequências no tecido ósseo do feto ainda pouco estudadas, da ação antiproliferativa do álcool sobre os osteoblastos e a ausência de trabalhos na literatura consultada que avaliem os efeitos do consumo do álcool durante a gestação nos osteoblastos dos recém-nascidos, torna-se interessante estudar o efeito desta substância em osteoblastos de recém-nascidos de ratas submetidas ao consumo crônico de etanol durante a gestação.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta desta pesquisa foi avaliar o efeito do consumo crônico de álcool em osteoblastos obtidos da calvária de recém-nascidos de ratas submetidas ao consumo crônico de etanol a 20% durante a gestação. Para tanto, analisou-se o comportamento celular baseado na adesão, proliferação e viabilidade celular, no conteúdo de proteína total, na atividade de fosfatase alcalina e na quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOSJC-UNESP) e aceito sob o protocolo nº 002/2010 (Anexo A), além disso, foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.1 Animais

Para este trabalho foram utilizadas dezoito ratas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*) de idade adulta (por volta de três meses de idade), com peso corpóreo em média de 300 g, fornecidas pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas à temperatura ambiente e alimentados com dieta sólida e líquida controladas, dependendo do grupo experimental.

4.1.1 Gestação

As ratas foram acasaladas e para verificação do início da prenhez foi realizado o esfregaço vaginal, utilizando-se uma cureta que, depois de flambada, foi colocada em uma solução de NaCl 0,9%, e

introduzida na vagina da rata. A secreção obtida foi colocada em uma lâmina de vidro e, mediante observação ao microscópio óptico, foi verificada a presença ou não de espermatozoides, além da fase estro do ciclo estral (Figura 1). Este critério foi o fator de diagnóstico positivo de prenhez, sendo então considerado o dia zero de prenhez (Kato et al., 1979). Após o diagnóstico positivo as ratas foram tratadas de acordo com o grupo experimental.

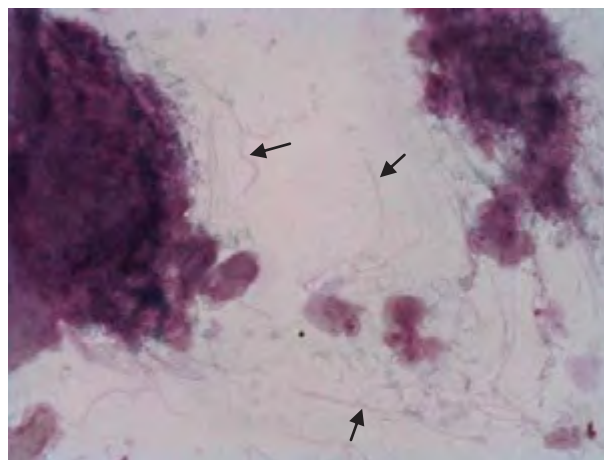


Figura 1 – Esfregaço vaginal com presença de espermatozoides (setas) confirmando a prenhez.

4.1.2 Grupos experimentais

A partir da constatação da prenhez, as ratas foram divididas em três grupos:

- a) Grupo Controle: tratadas com água e ração à vontade;
- b) Grupo álcool: tratadas com solução alcoólica à 20%, diariamente, por vinte e um dias e com ração à vontade;

- c) Grupo controle nutricional isocalórico: tratadas com dieta líquida contendo sacarose e ração com a quantidade média ingerida de véspera pelo grupo álcool, além de água à vontade.

A dieta sólida empregada para todos os grupos foi a ração Nutrilabor (Guabi, Campinas, SP, BR). O grupo álcool recebeu 50 g de ração diariamente por animal. No dia seguinte, as porções restantes foram pesadas e assim, foi obtida a quantidade média de ração ingerida, que então foi fornecida para os animais do grupo isocalórico. O grupo controle recebeu dieta sólida à vontade.

Os animais do grupo álcool receberam álcool etílico absoluto ACS-99,5° (Synth, Diadema, SP, BR), durante todo período da gestação, a partir do dia zero. As soluções foram preparadas e oferecidas diariamente na concentração alcoólica de 20%. Foram fornecidos 50 mL de solução alcoólica para cada rata. e no dia seguinte registrada a quantidade de solução alcoólica ingerida. O grupo isocalórico recebeu a mesma quantidade de solução de sacarose que o grupo álcool ingeriu de solução alcoólica, além de água à vontade. O grupo controle recebeu água á vontade (Rocha, 2005).

4.1.3 Eutanásia dos animais

Transcorridos vinte e um dias da gestação, os filhotes nasceram por parto normal. Para a coleta da calvária, os mesmos foram eutanasiados aos três dias de vida por decapitação (Figura 2).



Figura 2 –Animais aos três dias de vida.

4.2 Procedimentos de cultura celular

4.2.1 Isolamento de células da linhagem osteoblástica e desenvolvimento de cultura primária osteogênica

Depois de retiradas as calvárias, estas foram lavadas primeiramente em solução de fosfato tamponada (PBS, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) com gentamicina 1% (Gibco). A seguir foram limpas delicadamente em lenço estéril (Kimwippes, Kimberly-Clark Corporation, GA, EUA) para retirada dos tecidos moles. Finalmente, as calvárias foram lavadas em uma solução contendo 90% de solução de PBS (Gibco) associado a 1% de gentamicina (Gibco) e 9% de Meio Essencial Mínimo, modificação alfa, com L-glutamina (α -MEM, Gibco), e durante essa lavagem as suturas foram retiradas com auxílio de uma tesoura estéril (Figura 3).

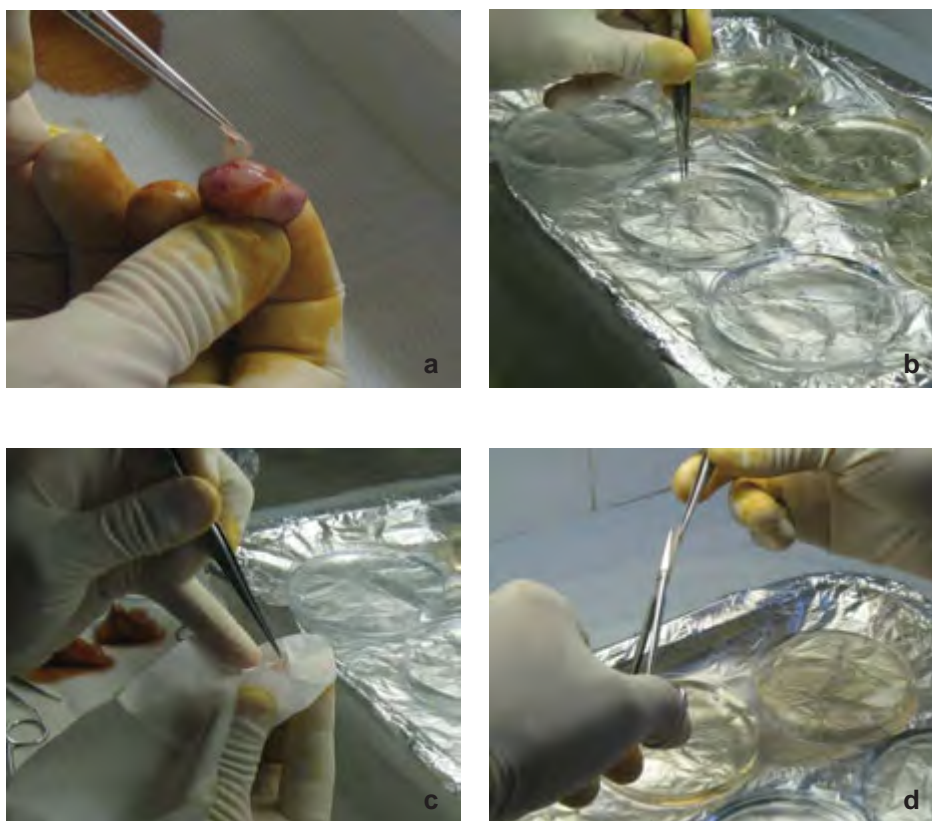


Figura 3 – Isolamento de células osteogênicas. a) remoção da calvária; b) banhos sequenciais; c) remoção de tecidos moles; d) remoção das suturas.

As células osteogênicas foram isoladas, por digestão enzimática sequencial, dos fragmentos de calvária dos filhotes cujas mães foram previamente tratadas de acordo com cada grupo experimental. A digestão enzimática foi realizada utilizando solução de tripsina 0,25% (Gibco) e collagenase tipo II 0,1% (Gibco), como descrito previamente por Oliveira e Nanci (2004). Nesse processo foi necessária a utilização de banho-maria com agitação (Banho metabólico Dubnoff MA-095/CF) e fragmentação manual das calvárias para auxiliar a remoção das células. Adicionalmente, foi realizada a centrifugação (Centrífuga Labnet - HERMLE Z 300 K) para auxiliar na formação do *pellet* celular, depois de formado o *pellet* as células foram homogeneizadas novamente e filtradas em filtro de 200 μm para serem plaqueadas (Figura 4).

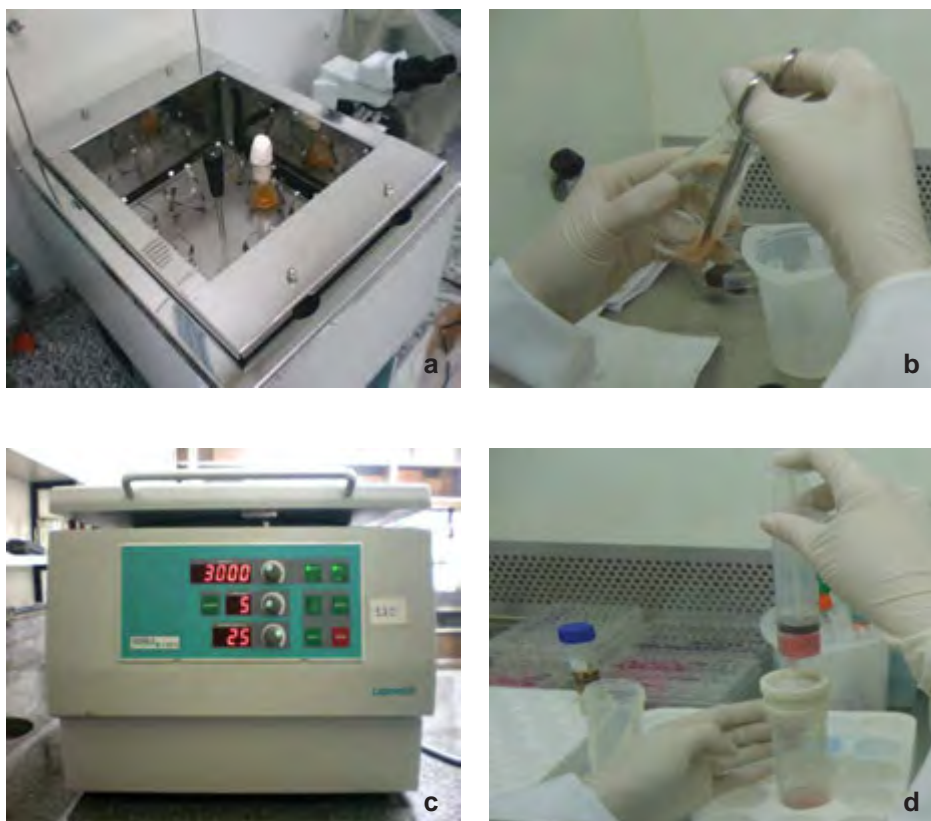


Figura 4 – Isolamento de células osteogênicas. a) banho maria (Banho metabólico Dubnoff MA-095/CF) sob agitação; b) fragmentação manual das calvárias; c) centrifugação (Centrífuga Labnet HERMLE Z 300 K); d) filtragem das células osteogênicas para cultura.

As células foram plaqueadas em placas de poliestireno de 24 poços, na densidade de 20.000 células/poço. Estas células foram cultivadas por períodos de até 14 dias em solução de α -MEM (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 7 mM de beta-glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma) e 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco), à temperatura de 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ (Incubadora Ultrasafe HF 212 UV). O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura avaliada por microscopia de fase invertida (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany).

4.2.2 Adesão celular

Para avaliação da adesão celular, as células foram cultivadas por 4 e 24 h após o isolamento celular. Após a remoção do meio de cultura os poços inicialmente plaqueados com densidade celular de 20.000 células/poço foram lavados três vezes com PBS (Gibco) a 37°C, para a remoção das células não aderidas. No período de 4 h as células aderidas foram enzimaticamente removidas dos poços com a utilização de 1 mM de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA, Gibco), tripsina 0,25% (Gibco) e 1,3 mg/mL de colagenase tipo II (Gibco) e contadas na câmara de Neubauer (Optik Labor). No período de 24 h as células aderidas foram removidas, como descrito anteriormente, coradas com azul de Trypan 0,4% (Gibco) e contadas na câmara de Neubauer (Figura 5) (Rosa, Beloti, 2003). Os valores obtidos foram expressos em porcentagem de células em relação ao número inicial de células.

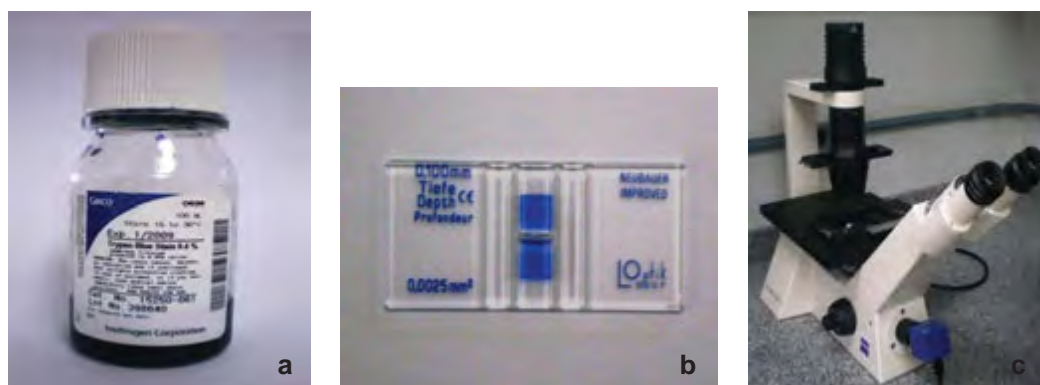


Figura 5 – Adesão celular. a) corante azul de Trypan; b) câmara de Neubauer; c) microscópio (Microscópio Carl Zeiss Microlimaging GmbH – Axiovert 40C, Germany) utilizado para contagem das células.

4.2.3 Proliferação celular

Para avaliação da proliferação celular, as células foram cultivadas nos períodos de 1, 3, 7 e 10 dias após o isolamento celular. O meio de cultura foi removido dos poços, inicialmente plaqueados com densidade celular de 20.000 células/poço, e estes foram lavados três vezes com PBS (Gibco) a 37°C para remoção das células que não estavam aderidas. As células aderidas foram enzimaticamente removidas dos poços com a utilização de 1 mM de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA, Gibco), tripsina 0,25% (Gibco) e 1,3 mg/mL de colagenase tipo II (Gibco). Em seguida as células foram coradas com azul de Trypan 0,4% (Gibco) e contadas na câmara de Neubauer (Beloti et al., 2008). Os valores foram expressos em uma curva de crescimento celular em número de células por poço.

4.2.4 Determinação da viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas em três períodos: 3, 7 e 10 dias. A análise foi realizada pelo ensaio colorimétrico MTT [(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol)] (Sigma), que corresponde a um sal que é reduzido pela proteinase succinato desidrogenase ativa apenas em células viáveis. Inicialmente, foram preparadas alíquotas de MTT (Sigma) a 5 mg/mL em PBS (Gibco). Em seguida retirou-se o meio de cultura dos poços, plaqueados com densidade celular de 20.000 células/poço, que foram incubados com 1 mL solução de MTT a 10% em meio de cultura por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com

1 mL de PBS (Gibco) aquecido a 37°C. Em seguida, o PBS foi removido e adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (0,04 N HCL em isopropanol) em cada poço, o qual permaneceu sob agitação (Mesa Agitadora Orbital Solab) por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200 µL foram retiradas de cada poço e transferidas para poços identificados na placa de 96 poços para a mensuração colorimétrica em espectrofotômetro (Biotek – EL808IU) no comprimento de onda de 570 nm com correção para 650 nm (Rosa et al., 2009). Os dados foram expressos em densidade óptica (Figura 6).

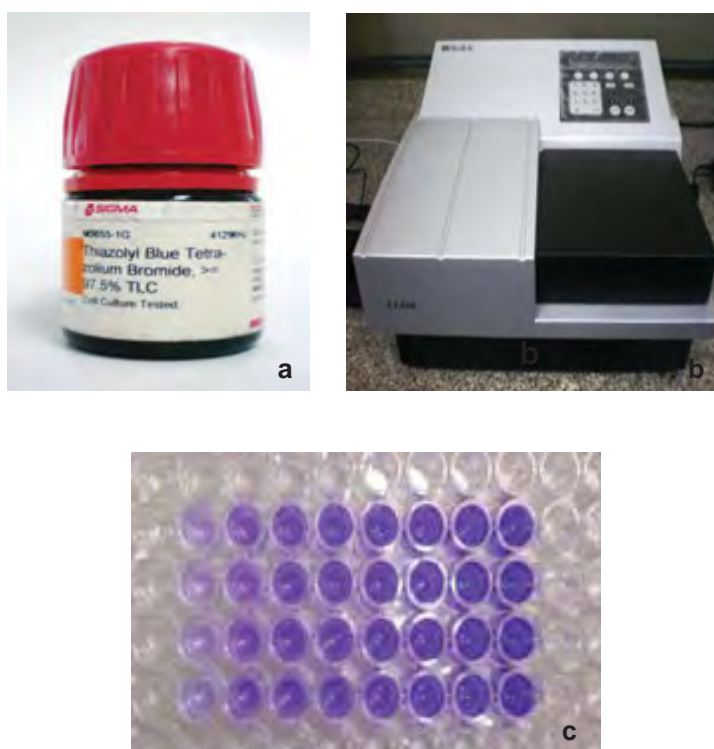


Figura 6 – MTT. a) sal MTT; b) espectrofotômetro (Biotek – EL808IU); c) placa de 96 poços contendo as alíquotas para leitura.

4.2.5 Conteúdo de proteína total (PTN)

O conteúdo de proteína total foi avaliado após 7, 10 e 14 dias de cultura, de acordo com o método modificado de Lowry et al. (1951). Após a remoção do meio de cultura dos poços, inicialmente plaqueados com densidade celular de 20.000 células/poço, estes foram lavados três vezes com PBS (Gibco) a 37°C e preenchidos com 2 mL de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma). Após 30 minutos, 1 mL da solução de cada poço foi misturado a 1 mL da solução de Lowry (Sigma), esta mistura permaneceu por 20 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 1 mL de reagente de Folin e Ciocalteau 20% (Sigma) e a mistura permaneceu por 30 minutos, em temperatura ambiente, para o desenvolvimento da cor. Após este período, a absorbância foi aferida espectrofotometricamente (Shimadzu Europa GmbH UV 1203) a 680 nm. O conteúdo de proteína total foi calculado a partir de uma curva padrão de albumina bovina (Sigma) e expresso em µg /mL (Figura 7).



Figura 7 – Proteína total. a) poços preenchidos com lauril sulfato de sódio; b) tubos de ensaio recebendo reagente de Lowry; c) reagente de Folin e Ciocalteu; d) tubos de ensaio contendo os reagentes e as alíquotas das amostras; e) espectrofotômetro (Shimadzu Europa GmbH UV 1203).

4.2.6 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de fosfatase alcalina foi determinada nos mesmos lisados celulares utilizados para a avaliação do conteúdo de proteína total, por meio da liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial (Labtest Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, BR), de acordo com as instruções do fabricante. Inicialmente, 50 μ L de timolftaleína monofosfato foram misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 M, pH 10,1 por 2 minutos a 37°C em banho-maria. A solução foi acrescida com uma alíquota de 50 μ L dos lisados obtidos de cada poço, permanecendo por 10 minutos a 37°C em banho-maria. Para o desenvolvimento da cor, foram adicionados 2 mL da solução de Na_2CO_3 a 0,09 M e NaOH a 0,25 M. Após 30 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu Europa GmbH UV 1203) utilizando comprimento de onda de 590 nm e a atividade de fosfatase alcalina calculada como preconizado no Kit comercial (De Oliva et al., 2009). Os dados foram expressos nos tempos de 7, 10 e 14 dias em μmol de timolftaleína/hora/mg de proteína através de fórmulas matemáticas (Figura 8).



Figura 8 – Fosfatase alcalina. a) lisados celulares; b) kit comercial Labtest; c) tubos de ensaio com reagentes recebendo alíquotas das amostras; d) tubos de ensaio contendo os reagentes e as alíquotas das amostras; e) espectrofotômetro (Shimadzu Europa GmbH UV 1203).

4.2.7 Quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada

Após 14 dias, o meio de cultura foi removido dos poços, inicialmente plaqueados com densidade celular de 20.000 células/poço, e estes foram lavados em 1 mL de solução de Hank's (Sigma) a 37°C por duas vezes e as células foram fixadas em 2 mL de álcool 70% (Synth) por 1 h em 4°C. Posteriormente, o álcool foi retirado e os poços foram lavados com 1 mL PBS (Gibco) por duas vezes. Em seguida, o PBS foi retirado, a cultura lavada com 1 mL de água deionizada por duas vezes e corada com vermelho de Alizarina S 2% (Sigma), pH 4,2, por 15 minutos à temperatura ambiente (De Oliva et al., 2009), depois lavou-se várias vezes cada poço para retirar o excesso de corante e as placas foram deixadas por 24 h em temperatura ambiente para secagem total dos poços. Este teste foi utilizado para a detecção macro e microscópica das formações nodulares e matriz mineralizada, os quais foram fotografados com câmera digital (Sony Digital F828, CyberShot, 8.0 megapixels).

A quantificação das formações mineralizadas foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory et al. (2004) e Rosa et al.(2009). Para tanto, 280 µL de ácido acético 10% foi adicionado em cada poço e incubado em temperatura ambiente, sob agitação, durante 30 minutos. Após este período, os poços foram raspados com auxílio de uma ponteira, para a remoção da película formada. Todo conteúdo de cada um dos poços foi transferido para microtubos de centrífuga de 1,5 mL, e agitados em vórtex (Vertex QL-901) por 30 segundos. Os microtubos foram levados ao banho-maria e aquecidos por 10 minutos, a 85°C sendo posteriormente, transferidos para um becker com gelo por 5 minutos. A seguir foram centrifugados por 20 minutos a 13000 G e 100 µL do sobrenadante foi transferido para poços identificados na placa de 96 poços. Nestes foram acrescidos 40 µL de hidróxido de amônia 10%, para neutralização do ácido e a leitura foi realizada, em espectrofotômetro

(Biotek - EL808IU), sob o comprimento de onda de 405 nm. Os valores foram expressos em densidade óptica (Figura 9).



Figura 9 – Quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada. a) sal de Hank's; b) corante vermelho Alizarina S; c) formações nodulares coradas com vermelho Alizarina S; d) os reagentes hidróxido de amônia e ácido acético; e) centrífuga (Centrífuga Labnet - HERMLE Z 300 K); f) espectrofotômetro (Biotek – EL808IU).

4.3 Método de análise dos resultados

Os dados apresentados neste trabalho são resultados representativos de três experimentos separados de culturas celulares estabelecidas a partir de animais diferentes (triplicata), com seis poços para todos os grupos testados para cada parâmetro avaliado (n=6).

O teste de Levene foi utilizado para testar a homocedasticidade das variâncias e o teste de Anderson-Darling para testar a normalidade da distribuição dos dados.

Na avaliação da adesão celular foi utilizado o teste t-Student para comparar os dados obtidos com o número inicial de células plaqueadas. Para comparar os grupos entre si foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

Para comparar os valores entre os períodos dentro do mesmo grupo, foi utilizado o teste de Friedman nos dados obtidos da proliferação e viabilidade celular, atividade da fosfatase alcalina e conteúdo de proteína total. Para determinar entre quais períodos a diferença estatística ocorreu foram comparados todos os períodos aos pares através do teste não-paramétrico de Wilcoxon.

Visando estabelecer comparações entre os grupos em cada um dos períodos de avaliação, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis nos dados obtidos de proliferação e viabilidade celular, atividade da fosfatase alcalina, conteúdo de proteína total e quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada. Além disso, para comparação da proliferação e viabilidade celular, atividade da fosfatase alcalina e conteúdo de proteína total em cada período para os grupos que demonstraram diferença estatística foram utilizado também o teste estatístico de Mann-Whitney.

Todos os resultados foram avaliados estatisticamente com um nível de significância definido de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Adesão celular

Para a adesão celular foi calculada a porcentagem de células aderidas em relação ao número inicial de células plaqueadas (20.000 células/poço). Os dados da quantidade de células aderidas, referentes à estatística descrita e os resultados do teste estatístico de T-Student ($p \leq 0,05$) estão apresentadas na figura 10 e tabela 1. Ao analisarmos a figura 10 verificou-se que em todos os grupos experimentais no período de 4 horas haviam menos células aderidas do que no período de 24 horas.

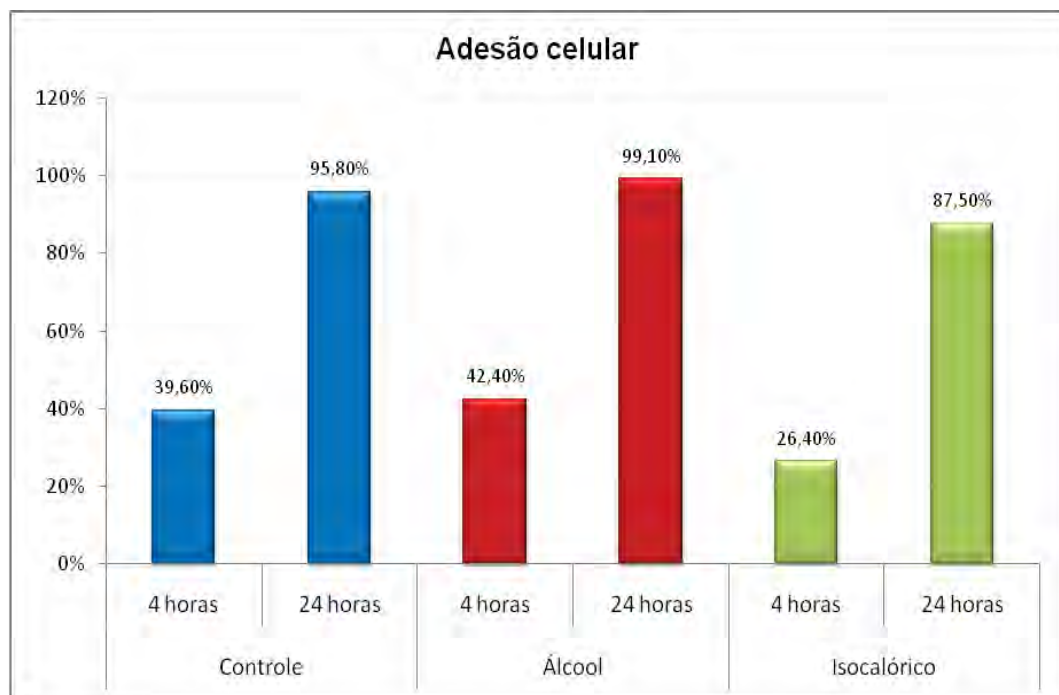


Figura 10 – Gráfico representativo da adesão celular em porcentagem de osteoblastos de cada grupo experimental nos vários períodos.

Tabela 1 – Média e \pm desvio padrão da adesão celular em porcentagem de osteoblastos de cada grupo experimental nos vários períodos

Adesão Celular	Grupo Controle (n= 18)		Grupo Álcool (n= 18)		Grupo Isocalórico (n= 18)	
	4 horas	24 horas	4 horas	24 horas	4 horas	24 horas
Média \pm desvio padrão	39,6 \pm 18,6*	95,8 \pm 41,7	42,4 \pm 30,2*	99,1 \pm 75,6	26,4 \pm 11,6*	87,5 \pm 32,6
p	0,001	0,677	0,001	0,959	0,001	0,122

*Diferença estatisticamente significativa

Na tabela 1 observa-se que em todos os grupos a porcentagem de células aderidas no período de 4 horas apresentou diferença estatisticamente significativa com relação ao número inicial de células. Foi utilizado o teste T-Student para a comparação das médias nos dois diferentes tempos em relação a um parâmetro fixo, ou seja, em relação a 100%.

Em seguida, foi realizada a comparação da adesão celular em cada período para todos os grupos, nesse caso utilizou-se o teste estatístico de Mann-Whitney. A tabela 2 mostra os valores de p da comparação dos grupos em si. Foi observada diferença estatisticamente significativa somente entre os grupos controle e isocalórico para o tempo de 4 horas.

Tabela 2 – Valores de p para adesão celular de osteoblastos em porcentagem entre os grupos em cada período

		Controle	Álcool
4 horas	Álcool	0,691	
	Isocalórico	0,016*	0,181
24 horas	Álcool	0,505	
	Isocalórico	0,545	0,874

*Diferença estatisticamente significativa

5.2 Proliferação celular

Pode ser observado na Figura 11 e Tabela 3 que a proliferação celular aumentou com o passar dos dias, independente do grupo avaliado. No entanto, o grupo controle obteve sempre, exceto no período de 1 dia, a menor média.

Comparando a proliferação celular nos diferentes grupos em cada período (1, 3, 7 e 10 dias), por meio do teste Kruskal-Wallis, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos, exceto no período de 1 dia (Tabela 3).

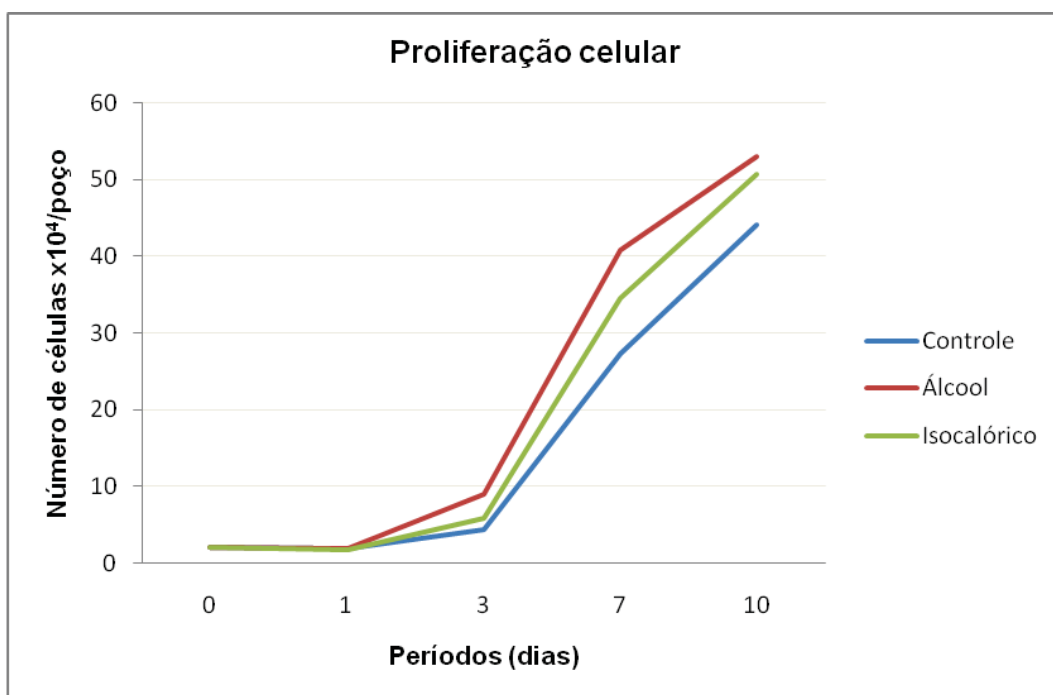


Figura 11 – Gráfico representativo da proliferação celular de osteoblastos em número de células x10⁴ por poço de cada grupo nos vários períodos.

Tabela 3 – Média e \pm desvio padrão da proliferação celular de osteoblastos em número de células $\times 10^4$ por poço entre os grupos em cada período

Proliferação Celular	1 dia	3 dias	7 dias	10 dias
Grupo Controle (n= 18)	1,92 \pm 0,83	4,40 \pm 2,45*	27,29 \pm 16,91*	44,08 \pm 7,51*
Grupo Álcool (n= 18)	1,98 \pm 1,51	8,95 \pm 4,04*	40,81 \pm 9,93*	53,01 \pm 7,81*
Grupo Isocalórico (n= 18)	1,75 \pm 0,65	5,86 \pm 1,52*	34,63 \pm 5,51*	50,65 \pm 10,52*
p	0,756	0,001	0,010	0,015

*Diferença estatisticamente significativa

Em seguida, foi realizada a comparação da proliferação celular em cada período para os grupos que demonstraram diferença estatística utilizando o teste estatístico de Mann-Whitney. Os resultados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Valores de p para proliferação celular de osteoblastos em número de células $\times 10^4$ por poço entre os grupos em cada período

		Controle	Álcool
3 dias	Álcool	0,001*	
	Isocalórico	0,026*	0,005*
7 dias	Álcool	0,008*	
	Isocalórico	0,048*	0,076
10 dias	Álcool	0,004*	
	Isocalórico	0,066	0,304

*Diferença estatisticamente significativa

O teste de Friedman foi utilizado para a comparação da proliferação celular de cada grupo ao longo do tempo, sendo observada diferença estatisticamente significativa em todos os grupos (Tabela 5).

Tabela 5 – Média e desvio padrão da proliferação celular de osteoblastos em número de células $\times 10^4$ por poço de cada grupo ao longo dos vários períodos

Proliferação Celular	Período	Média \pm desvio padrão	p
Controle (n= 18)	1 dia	1,92 \pm 0,83*	0,001
	3 dias	4,40 \pm 2,45*	
	7 dias	27,29 \pm 16,91*	
	10 dias	44,08 \pm 7,51*	
Álcool (n= 18)	1 dia	1,98 \pm 1,51*	0,001
	3 dias	8,95 \pm 4,04*	
	7 dias	40,81 \pm 9,93*	
	10 dias	53,01 \pm 7,81*	
Isocalórico (n= 18)	1 dia	1,75 \pm 0,65*	0,001
	3 dias	5,86 \pm 1,52*	
	7 dias	34,63 \pm 5,51*	
	10 dias	50,65 \pm 10,52*	

*Diferença estatisticamente significativa

A tabela 6 demonstra, através do teste estatístico de Wilcoxon, que houve diferença estatística em todos os grupos ao longo dos períodos.

Tabela 6 – Valores de p para proliferação celular de osteoblastos em número de células $\times 10^4$ por poço de cada grupo ao longo dos vários períodos

		1 dia	3 dias	7 dias
Controle	3 dias	0,003*		
	7 dias	0,001*	0,001*	
	10 dias	0,001*	0,001*	0,001*
	3 dias	0,001*		
Álcool	7 dias	0,001*	0,001*	
	10 dias	0,001*	0,001*	0,003*
	3 dias	0,001*		
	7 dias	0,001*	0,001*	
Isocalórico	7 dias	0,001*	0,001*	
	10 dias	0,001*	0,001*	0,001*
	3 dias	0,001*		

*Diferença estatisticamente significativa

5.3 Viabilidade celular

A estatística descritiva dos dados da viabilidade celular está demonstrada na Figura 12. Observou-se que a viabilidade celular aumentou gradualmente em todos os grupos ao longo dos vários períodos. Verificou-se também que o grupo álcool no período de 10 dias apresentou a maior taxa de viabilidade (Figura 12 e Tabela 7).

Comparando a viabilidade celular nos diferentes grupos em cada período (3, 7 e 10 dias), por meio do teste Kruskal-Wallis, verificou-se diferença estatisticamente significativa apenas no período de 3 dias, $p=0,001$ (Tabela 7).

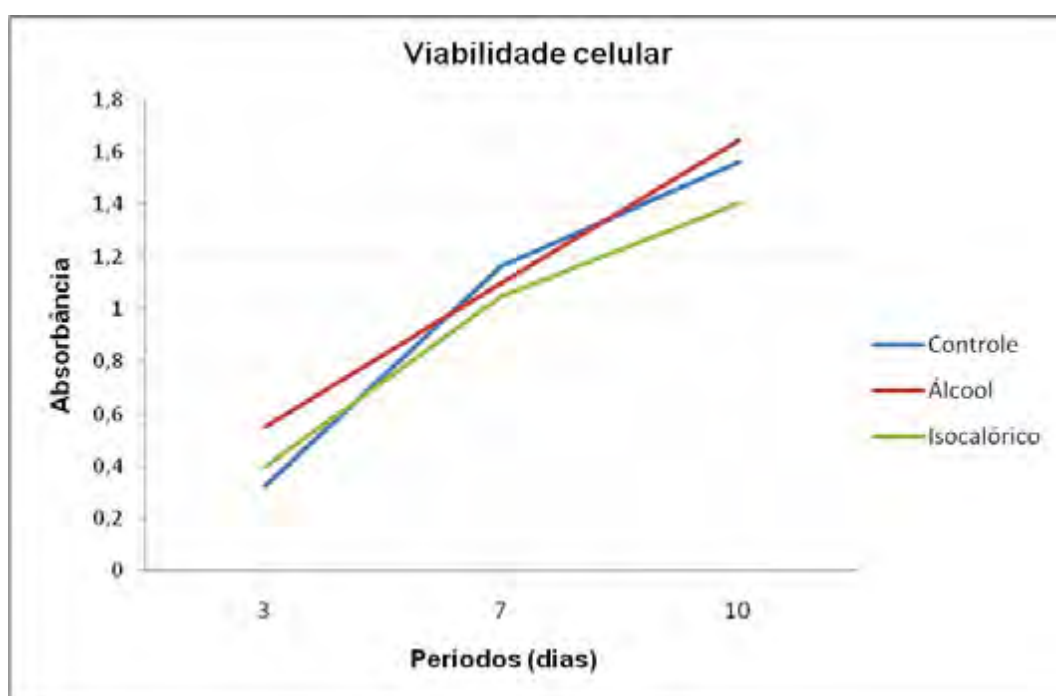


Figura 12 – Gráfico representativo da viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) de cada grupo nos vários períodos.

Tabela 7 – Média e desvio padrão da viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) entre os grupos em cada período

Viabilidade Celular	3 dias	7 dias	10 dias
Grupo Controle (n= 18)	0,322 ± 0,127*	1,163 ± 0,200	1,563 ± 0,384
Grupo Álcool (n= 18)	0,551 ± 0,153*	1,097 ± 0,185	1,643 ± 0,240
Grupo Isocalórico (n= 18)	0,398 ± 0,057*	1,048 ± 0,266	1,404 ± 0,393
p	0,001	0,263	0,203

*Diferença estatisticamente significativa

Em seguida, foi realizada a comparação da viabilidade celular, pelo teste estatístico de Mann-Whitney, para o período que demonstrou diferença estatística. Os resultados estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Valores de p para viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) entre os grupos em cada período

	Controle	Álcool
3 dias		
Álcool	0,001*	
Isocalórico	0,195	0,001*

*Diferença estatisticamente significativa

O teste de Friedman foi utilizado para a comparação da viabilidade celular de cada grupo ao longo do tempo, sendo observada diferença estatisticamente significativa em todos os grupos (Tabela 9).

Tabela 9 – Média e desvio padrão da viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) de cada grupo ao longo dos vários períodos

Viabilidade celular	Período	Média ± desvio padrão	p
Controle (n= 18)	3 dias	0,322 ± 0,127*	0,001
	7 dias	1,163 ± 0,200*	
	10 dias	1,563 ± 0,384*	
Álcool (n= 18)	3 dias	0,551 ± 0,153*	0,001
	7 dias	1,097 ± 0,185*	
	10 dias	1,643 ± 0,240*	
Isocalórico (n= 18)	3 dias	0,398 ± 0,057*	0,001
	7 dias	1,048 ± 0,266*	
	10 dias	1,404 ± 0,393*	

*Diferença estatisticamente significativa

Em seguida, foi realizada através do teste estatístico de Wilcoxon a comparação entre a viabilidade celular em cada grupo ao longo do tempo para os grupos que demonstraram diferença estatística. Os resultados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 – Valores de p para viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) de cada grupo ao longo dos vários períodos

		3 dias	7 dias
Controle	7 dias	0,001*	
	10 dias	0,001*	0,001*
Álcool	7 dias	0,001*	
	10 dias	0,001*	0,001*
Isocalórico	7 dias	0,001*	
	10 dias	0,001*	0,010*

*Diferença estatisticamente significativa

5.4 Conteúdo de proteína total

Para o conteúdo de proteína total, após a realização da estatística descritiva, observou-se que o grupo controle obteve a maior média quando se avaliou o período de 7 dias. No entanto, com 14 dias esse grupo exibiu a menor média (Figura 13 e Tabela 11).

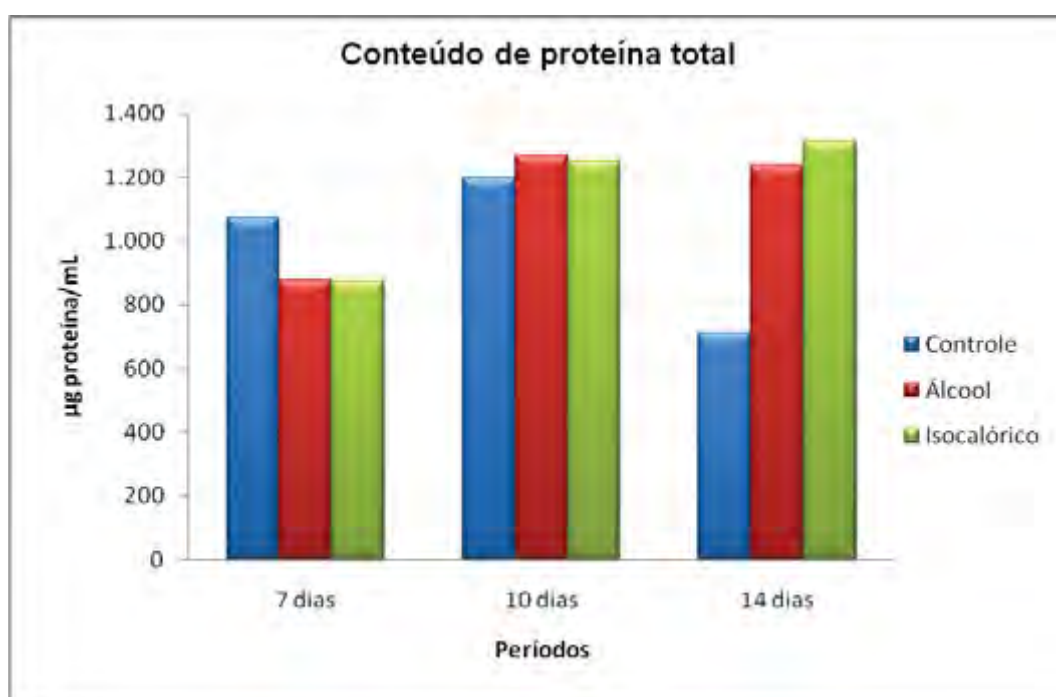


Figura 13 – Gráfico representativo do conteúdo de proteína total em µg /mL de cada grupo nos vários períodos.

Comparando os dados nos diferentes grupos em cada período, por meio do teste estatístico de Kruskal-Wallis (Tabela 11), observou-se que houve diferença estatística significativa nos períodos de 7 e 14 dias.

Tabela 11 – Média e desvio padrão do conteúdo de proteína total de osteoblastos em $\mu\text{g/mL}$ entre os grupos em cada período

Conteúdo de proteína total	7 dias	10 dias	14 dias
Grupo Controle (n= 18)	1074 \pm 324*	1198 \pm 135	710 \pm 309*
Grupo Álcool (n= 18)	877 \pm 97*	1268 \pm 140	1236 \pm 153*
Grupo Isocalórico (n= 18)	874 \pm 138*	1251 \pm 241	1313 \pm 202*
p	0,009	0,540	0,001

*Diferença estatisticamente significativa

Em seguida, foi realizada a comparação do conteúdo de proteína total em cada período para os grupos que demonstraram diferença estatística, utilizando o teste estatístico de Mann-Whitney. Os resultados estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12 – Valores de p para conteúdo de proteína total de osteoblastos em $\mu\text{g/mL}$ entre os grupos em cada período

		Controle	Álcool
7 dias	Álcool	0,016*	
	Isocalórico	0,005*	0,752
14 dias	Álcool	0,001*	
	Isocalórico	0,001*	0,174

*Diferença estatisticamente significativa

O teste de Friedman foi utilizado para a comparação do conteúdo de proteína total de cada grupo ao longo do tempo, sendo observada diferença estatisticamente significativa em todos os grupos (Tabela 13).

Tabela 13 – Média e desvio padrão do conteúdo de proteína total de osteoblastos em $\mu\text{g/mL}$ de cada grupo ao longo dos vários períodos

Proteína Total	Período	Média \pm desvio padrão	p
Controle (n= 18)	7 dias	1074 \pm 324*	0,001
	10 dias	1198 \pm 135*	
	14 dias	710 \pm 309*	
Álcool (n= 18)	7 dias	877 \pm 97*	0,001
	10 dias	1268 \pm 140*	
	14 dias	1236 \pm 153*	
Isocalórico (n= 18)	7 dias	874 \pm 138*	0,001
	10 dias	1251 \pm 241*	
	14 dias	1313 \pm 202*	

*Diferença estatisticamente significativa

Em seguida, foi realizada através do teste estatístico de Wilcoxon a comparação entre o conteúdo de proteína total em cada grupo ao longo do tempo para os grupos que demonstraram diferença estatística. Os resultados estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14 – Valores de p para conteúdo de proteína total de osteoblastos em $\mu\text{g/mL}$ de cada grupo ao longo dos vários períodos

		7 dias	10 dias
Controle	10 dias	0,133	
	14 dias	0,001*	0,001*
Álcool	10 dias	0,001*	
	14 dias	0,001*	0,616
Isocalórico	10 dias	0,001*	
	14 dias	0,001*	0,586

*Diferença estatisticamente significativa

5.5 Atividade da fosfatase alcalina

Após realizar a estatística descritiva dos dados para avaliar a atividade da fosfatase alcalina, notou-se que o grupo controle, nos três períodos de análise, obteve o menor resultado em relação aos grupos álcool e isocalórico. Verificou-se também que nos grupos álcool e isocalórico houve um aumento da atividade da fosfatase alcalina nos períodos de 7 para 10 dias e depois uma redução do período de 10 para 14 dias (Figura 14).

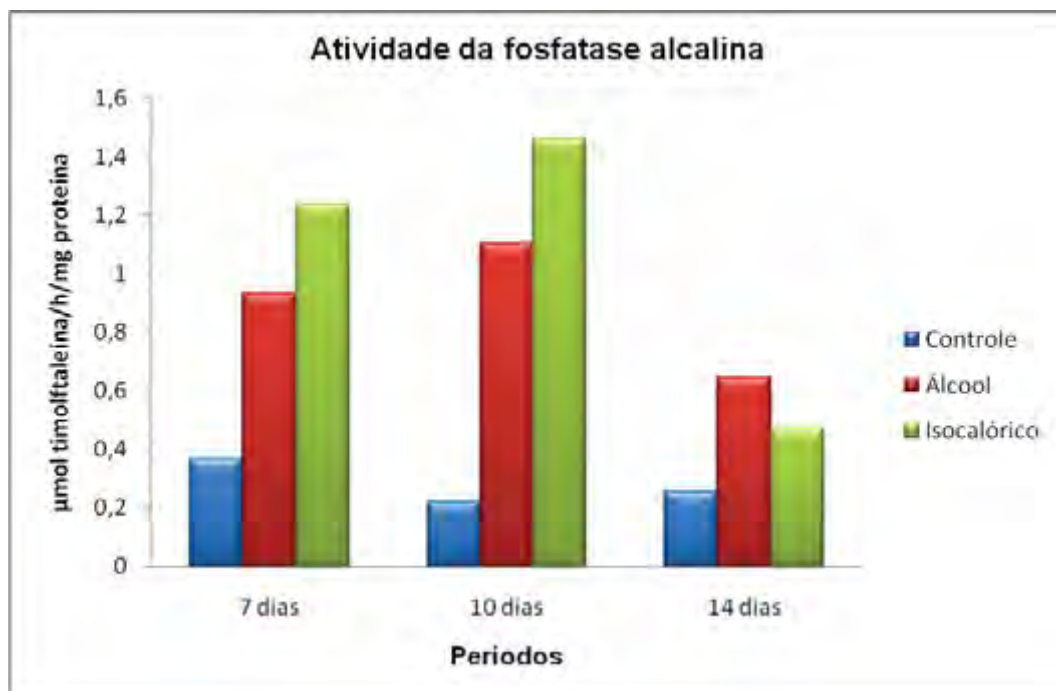


Figura 14 – Gráfico representativo da atividade da fosfatase alcalina em μmol timolftaleína/h/mg proteína de cada grupo nos vários períodos.

Na tabela 15 pode ser observado, por meio do teste Kruskal-Wallis, que existe diferença estatística entre os grupos, em todos os períodos de avaliação

Tabela 15 – Média e desvio padrão da atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos em μmol timolftaleína/h/mg proteína entre os grupos em cada período

Atividade da fosfatase alcalina	7 dias	10 dias	14 dias
Grupo Controle (n= 18)	0,369 $\pm 0,267^*$	0,221 $\pm 0,210^*$	0,256 $\pm 0,174^*$
Grupo Álcool (n= 18)	0,931 $\pm 0,552^*$	1,105 $\pm 0,492^*$	0,647 $\pm 0,228^*$
Grupo Isocalórico (n= 18)	1,237 $\pm 0,787^*$	1,462 $\pm 0,693^*$	0,472 $\pm 0,128^*$
p	0,001	0,001	0,001

*Diferença estatisticamente significativa

A tabela 16 mostra a comparação da atividade da fosfatase alcalina em cada período para os grupos que demonstraram diferença estatística, utilizando o teste estatístico de Mann-Whitney, sendo que tal diferença ocorreu entre o grupo controle e os demais grupos.

Tabela 16 – Valores de p para atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos em μmol timolftaleína/h/mg proteína entre os grupos em cada período

		Controle	Álcool
7 dias	Álcool	0,001*	
	Isocalórico	0,003*	0,393
10 dias	Álcool	0,001*	
	Isocalórico	0,001*	0,137
14 dias	Álcool	0,001*	
	Isocalórico	0,001*	0,011*

*Diferença estatisticamente significativa

O teste de Friedman foi utilizado para a comparação da atividade da fosfatase alcalina de cada grupo ao longo do tempo, sendo

observada diferença estatisticamente significativa nos grupos álcool e isocalórico (Tabela 17).

Tabela 17 – Média e desvio padrão da atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos em μmol timolftaleína/h/mg proteína de cada grupo ao longo dos vários períodos

Atividade da fostase alcalina	Período	Média \pm desvio padrão	p
Controle (n= 18)	7 dias	0,369 \pm 0,267	0,135
	10 dias	0,221 \pm 0,210	
	14 dias	0,256 \pm 0,174	
Álcool (n= 18)	7 dias	0,931 \pm 0,552*	0,017
	10 dias	1105 \pm 0,492*	
	14 dias	0,647 \pm 0,228*	
Isocalórico (n= 18)	7 dias	1237 \pm 0,787*	0,001
	10 dias	1462 \pm 0,693*	
	14 dias	0,472 \pm 0,128*	

*Diferença estatisticamente significativa

A Tabela 18 mostra, através do teste estatístico de Wilcoxon, a comparação da atividade da fosfatase alcalina em cada período para os grupos que demonstraram diferença estatística. Nota-se que no grupo isocalórico a diferença estatística ocorreu entre todos os períodos, mas no grupo álcool houve diferença entre 10 e 14 dias.

Tabela 18 – Valores de p para atividade da fosfatase alcalina de osteoblastos em μmol timolftaleína/h/mg proteína de cada grupo ao longo dos vários períodos

		7 dias	10 dias
Álcool	10 dias	0,372	
	14 dias	0,078	0,002*
Isocalórico	10 dias	0,048*	
	14 dias	0,005*	0,001*

*Diferença estatisticamente significativa

5.6 Quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada

A estatística descritiva destes dados está apresentada na Figura 15 e Tabela 19, pela qual se observou que o grupo controle apresentou pequeno teor de cálcio em relação aos grupos experimentais.



Figura 15 – Gráfico representativo de formações nodulares e de matriz mineralizada em densidade óptica (405 nm) de cada grupo período de 14 dias.

A Tabela 19 mostra através do teste estatístico de Kruskal-Wallis que a diferença existente entre os grupos foi estatisticamente significativa e essa diferença pode ser vista macroscopicamente na Figura 16.

Tabela 19 – Média e desvio padrão de formações nodulares e de matriz mineralizada em densidade óptica (405 nm) de cada grupo período de 14 dias

Formações nodulares e de matriz mineralizada	Controle	Álcool	Isocalórico
Média ± desvio padrão	0,048 ± 0,015*	1699 ± 1358*	0,582 ± 0,570*
p		0,001	

*Diferença estatisticamente significativa

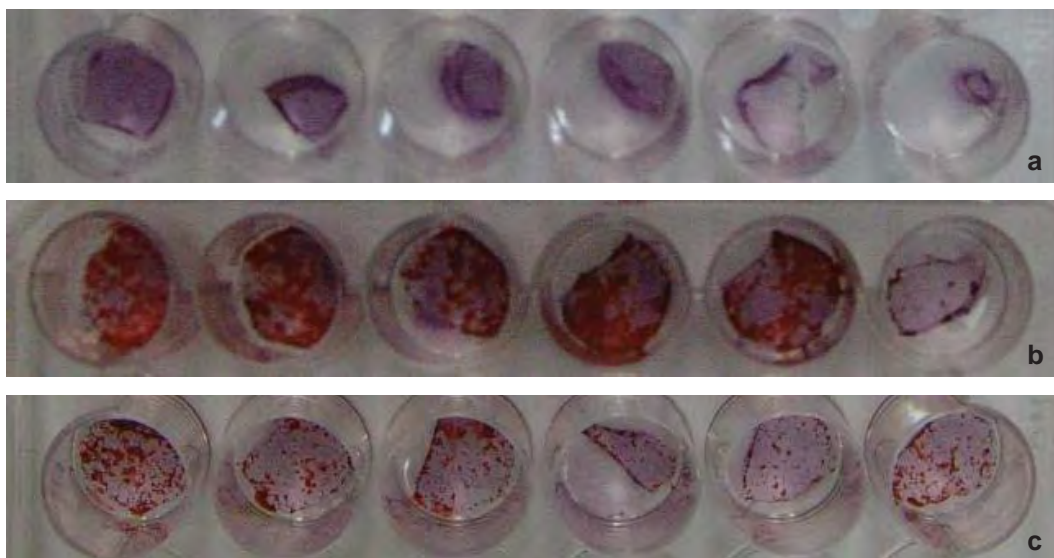


Figura 16 – Fotos das formações de matriz mineralizada. a) grupo controle; b) grupo álcool; c) grupo isocalórico.

6 DISCUSSÃO

O álcool é uma substância que, se consumida regularmente, pode causar alterações sobre a saúde do indivíduo que o consome, dependendo do tipo de bebida e da quantidade consumida. Segundo Micallef et al. (2007) o consumo de 400 mL por dia de vinho tinto, tipo carbenet sauvignon, aumenta a concentração sérica de antioxidantes e conseqüentemente proporciona ao indivíduo uma proteção no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Berg et al. (2008) também constataram que o consumo crônico de álcool de até um drinque por dia pode ter um efeito benéfico para o tecido ósseo. Os autores verificaram este efeito, depois de fazerem uma revisão sistemática da literatura associando a frequência, a quantidade do consumo de álcool e a densidade óssea dos indivíduos que o consomem.

Em contrapartida, outros trabalhos demonstraram que o consumo crônico exagerado de bebida alcoólica pode estar associado com doenças hepáticas (Fleming et al., 2010), cardiovasculares (Fleming et al., 2010), distúrbios do trato digestivo (Lieber, 2003; Fleming et al., 2010) e câncer, particularmente das vias aéreas superiores e do trato digestivo (Seitz, Becker, 2007). Adicionalmente, estudos clínicos mostraram que o consumo crônico está associado com osteopenia e aumento do risco de fraturas (Klein, 1997).

O mecanismo da osteopenia associada ao álcool não está claramente elucidado, mas parece envolver um efeito direto do álcool sobre as células ósseas, que leva à supressão da formação de osso novo (Chakkalakal, 2005) e/ou por um excesso de reabsorção óssea dependente da atividade do osteoclasto (Daí et al., 2000). Experimentos *in vitro* (Friday, Howard, 1991; Chavassieux et al., 1993; Klein et al., 1996)

utilizando culturas de células osteoblásticas e *in vivo* (Dyer et al., 1998) indicaram que as reduções observadas na formação óssea resultam do efeito direto e antiproliferativo do etanol sobre o osteoblasto. A remodelação e a mineralização óssea são processos dependentes destas células, logo os efeitos deletérios do álcool sobre os osteoblastos resultam no retardo da formação óssea, da remodelação do tecido ósseo e, finalmente, osteopenia e fraturas.

A sensibilidade das células ósseas aos efeitos nocivos do álcool pode ser ainda maior durante o seu desenvolvimento no útero (Wezeman et al., 1999), já que em gestantes o abuso crônico de bebidas alcoólicas conduz à Síndrome Alcoólica Fetal e outros efeitos teratogênicos importantes como alterações no desenvolvimento do esqueleto fetal (Rifas et al., 1997, Miranda et al., 2010). Entretanto, os efeitos específicos do álcool no esqueleto ainda não estão bem estabelecidos devido à dificuldade em se distinguir o efeito do etanol no tecido ósseo e no metabolismo (Turner, 2000). Assim, diversos trabalhos têm utilizado animais de laboratório para verificar os efeitos do álcool sobre o tecido ósseo (Dyer et al., 1998; Daí et al., 2000; Hogan et al., 2001; Chakkalakal et al., 2002; Rocha, 2005; Torricelli et al., 2007; Torricelli et al., 2008; Rosa et al., 2008; Chen et al., 2009; Deco et al., 2010).

No presente estudo foi avaliado o efeito do consumo crônico de álcool em osteoblastos obtidos da calvária de ratos recém-nascidos. A administração do álcool foi realizada via oral para as ratas prenhas durante todo o período da gestação, 21 dias, sendo que não encontramos na literatura trabalhos experimentais com a metodologia empregada. A dieta líquida oferecida às ratas durante a gestação foi estabelecida na concentração de 20% de etanol em solução aquosa, uma vez que esta concentração já foi utilizada em estudos prévios e demonstrou fornecer o aporte hídrico necessário para o animal e ser tóxica o suficiente para promover alterações fisiológicas sem provocar a

morte do mesmo (Rocha, 2005; Souza et al., 2006; Souza, Rocha, 2009; Souza et al., 2009; Deco et al., 2010).

Vários trabalhos avaliaram os efeitos do álcool *in vitro*, por meio da adição direta do etanol ao meio de cultura oferecido às células osteoblásticas (Friday, Howard, 1991; Chavassieux et al., 1993; Klein et al., 1996). No entanto, estes experimentos *in vitro*, acima citados, não investigaram o comportamento das células osteoblásticas derivadas de animais tratados com álcool, conforme a metodologia utilizada neste estudo. Rosa et al. (2008) estudaram o efeito do alcoolismo crônico sobre células osteoblásticas obtidas dos fêmures de ratos, os quais foram previamente submetidos à ingestão crônica de etanol a 20% por 15 dias. Posteriormente à remoção das células, a cultura foi submetida ou não à presença direta de etanol. Os resultados indicaram que o consumo crônico de etanol seguido da exposição celular ao mesmo, inibiu a diferenciação dos osteoblastos, já que houve aumento da proliferação celular e redução da formação de matriz mineralizada.

As alterações do osso à exposição crônica de etanol têm sido explorada por diferentes técnicas, como histomorfológica, biomecânica, molecular, e de quantificação de minerais. Adicionalmente, avaliando a estrutura óssea, a inibição do crescimento é evidenciada pela redução do comprimento dos ossos longos, diminuição do desenvolvimento trabecular bem como da densidade óssea (Wezeman et al., 1999).

No presente estudo, os métodos utilizados para verificar os efeitos do álcool foram baseados em parâmetros chaves da osteogênese *in vitro*, tais como a adesão, proliferação e viabilidade celular, o conteúdo de proteína total, a atividade de fosfatase alcalina e a quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada. Esta metodologia foi baseada em trabalhos prévios que também analisaram *in vitro* o comportamento de células ósseas (Friday, Howard, 1991; Chavassieux et al., 1993; Klein et al., 1996; Rosa et al., 2002; Rosa,

Beloti, 2003; Beloti, Rosa, 2005; Rosa, Beloti, 2005; Simão et al., 2007; Torricelli et al., 2007; Beloti et al., 2008; Rosa et al., 2008; Torricelli et al., 2008; De Oliva et al., 2009; Rosa et al., 2009). No entanto, a comparação direta entre os dados do nosso estudo com trabalhos prévios não foi possível, uma vez que não foram encontrados relatos na literatura que avaliaram a atividade de células osteoblásticas obtidas da calvária de ratos recém-nascidos, após o consumo crônico do álcool durante a gestação. Assim, foi realizada a discussão dos nossos resultados com os trabalhos que administraram o álcool de modo crônico.

A osteogênese, induzida por células osteoblásticas, é caracterizada por uma sequência de eventos que inicialmente envolvem a adesão e a proliferação celular seguidas pela expressão do fenótipo osteoblástico (Stein, Lian, 1995). Assim, consideramos importante estudar a influência do álcool nos eventos celulares iniciais como o processo de adesão celular, uma vez que na literatura pesquisada não foram encontrados trabalhos com essa análise.

Em geral, os dados de adesão celular não mostraram diferença estatística entre os grupos, independente dos períodos. Foi observada diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos controle e isocalórico no período de 4 horas, sendo que o grupo controle apresentou maior adesão celular. Esta diferença talvez possa ser explicada pela deficiência nutricional do grupo isocalórico, que pode ter alterado a capacidade de adesão das células. Segundo Klein (1997) a função dos osteoblastos normais depende da nutrição adequada. O álcool tem alto poder calórico e por isso geralmente supre o alimento na dieta de alcoolistas, levando esses indivíduos a desnutrição. Logo, a instituição do grupo isocalórico neste experimento, assim como em outros estudos que avaliaram a ação do álcool sobre o tecido ósseo (Dyer et al., 1998; Chakkalakal et al., 2002; Rocha, 2005; Chen et al., 2009; Deco et al., 2010), foi necessária para o controle nutricional.

Estudos mostraram que a proliferação de osteoblastos pode ser influenciada pelo consumo crônico de álcool (Dyer et al., 1998; Torricelli et al., 2007). Em nosso estudo a proliferação dos osteoblastos aumentou ao longo do tempo, em todos os grupos avaliados, demonstrando a progressão da cultura celular. Entretanto, o grupo álcool obteve sempre a maior média em número de células proliferadas. Este resultado está de acordo com o estudo de Rosa et al., (2008), que após remover células do fêmur de ratos, previamente submetidos à ingestão crônica de álcool, verificaram também que o consumo de etanol promoveu efeito estimulador às células, quando não exposto em contato direto com a cultura celular. Segundo estes autores as diferenças nos valores da proliferação celular, observadas entre os vários estudos podem ser atribuídas a fontes de células diferentes. Por outro lado, nossos resultados divergem dos obtidos por Friday e Howard (1991), Chavassieux et al. (1993) e Klein et al. (1996), que mostraram efeito antiproliferativo do álcool sobre as células osteoblásticas. Todavia esses trabalhos avaliaram os efeitos do álcool *in vitro* com adição direta do etanol ao meio de cultura oferecido aos diferentes tipos de células osteoblásticas, diferentemente do nosso estudo que avaliou o efeito do etanol sistemicamente. Outro aspecto importante a ser levado em consideração é a metodologia empregada nos vários trabalhos, pois alguns autores utilizam o álcool no meio de cultura e outros somente sistemicamente.

Com relação à viabilidade celular, nossos resultados demonstraram um aumento gradual de células viáveis ao longo dos vários períodos, independente do grupo. Estes resultados indicam que o consumo de etanol na concentração utilizada apresentou baixos níveis de citotoxicidade, ou até mesmo não exibiu toxicidade. Comparando-se os grupos, notou-se diferença estatística apenas no período de 3 dias, em que o grupo álcool apresentou maior taxa de viabilidade em relação aos outros grupos. Essa diferença entre a maior viabilidade do grupo álcool

em relação ao grupo isocalórico talvez possa ser explicada pela deficiência nutricional do grupo isocalórico, que pode ter alterado a capacidade da célula ser viável. No estudo de Rosa et al. (2008) a viabilidade das células que receberam ou não o etanol em seu meio de cultura foi em torno de 90%. Segundo estes autores, a alta taxa de viabilidade demonstra que o efeito inibitório do etanol sobre a formação óssea não é provocado por toxicidade celular direta como sugerido por Maran et al., (2001). Por outro lado, Torricelli et al. (2008) verificaram uma diminuição da viabilidade celular e da atividade sintética dos osteoblastos expostos ao etanol quando cultivados em amostras puras de titânio.

As proteínas totais representam a atividade sintética das células, e também podem ser consideradas parâmetro chave para avaliação da osteogênese *in vitro* (Beloti, Rosa, 2005). Estudos têm demonstrado que o etanol reduz a atividade de síntese celular (Dyer et al. 1998; Rosa et al. 2008). Dyer et al., (1998) avaliaram os efeitos do etanol sobre a proliferação celular e a atividade osteoblástica em modelo animal *in vivo* e observaram uma redução nos níveis de osteocalcina. Concordando com esses resultados prévios, Rosa et al., (2008) também obtiveram a quantidade de proteína total reduzida, quando as células foram cultivadas na presença de etanol. Entretanto, as células derivadas de animais tratados com etanol e cultivadas na sua ausência foram capazes de manter uma atividade sintética semelhante ao das células do grupo controle nos períodos de 14 e 21 dias. Logo, os autores acreditam que os efeitos deletérios do etanol sobre a atividade sintética das células não é permanente e pode ser invertida removendo as células da exposição ao etanol.

Nossos resultados mostraram que aos 10 dias todos os grupos apresentavam quantidade similar de proteína total, sugerindo que a atividade sintética das células estavam semelhantes, assim como nos resultados de Rosa et al., (2008). No entanto, o grupo controle obteve a maior média de produção de proteína total no período de 7 dias e aos 14

dias mostrou a menor média, exibindo diferença estatística com relação aos grupos álcool e isocalórico. Estes valores talvez possam estar relacionados com a diferenciação celular, já que no período de 7 dias a proliferação celular nos grupos álcool e isocalórico eram maiores estatisticamente do que no grupo controle. Este resultado sugere que as células estavam se proliferando, porém com baixa atividade de síntese. Aos 10 dias a proliferação dos grupos álcool e isocalórico continuaram maiores, porém com diferença estatística apenas para o grupo álcool em relação ao grupo controle. Uma vez que existe uma sequência longitudinal para os eventos celulares no desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, sendo eles; proliferação celular, expressão de marcadores de osteoblastos, síntese, deposição e maturação de colágeno da matriz extracelular e mineralização da matriz (Stein, Lian, 1995), a síntese de proteína total pode ter sido atrasada nos grupos álcool e isocalórico, devido à grande proliferação por eles apresentada.

Os osteoblastos são células caracteristicamente produtoras de fosfatase alcalina. Esta enzima está localizada na superfície externa da célula, onde exerce sua atividade (Szejnfeld, 2000; Mödder, Klosa, 2008). O papel primário da fosfatase alcalina está relacionado com a mineralização do tecido ósseo. Assim, em estudos *in vitro*, a diferenciação celular pode ser avaliada pelos níveis de atividade de fosfatase alcalina. Adicionalmente, esta enzima tem sido relacionada como fator de progressão entre a variedade osteogênica e a condição da mineralização dos osteoblastos (Simão et al., 2007; Hoemann et al., 2009).

Maran et al., (2001) verificaram influência do etanol sobre a atividade da fosfatase alcalina, utilizando linhagem de células osteoblásticas humanas imortalizadas, apenas no período de 7 dias. Os autores concluíram que esta influência depende da concentração e do tempo de exposição ao etanol. Por outro lado, Klein et al., (1996) mostraram aumento da fosfatase em apenas 72 horas para as células do

tipo TE-85. No estudo de Rosa et al., (2008) a atividade da fosfatase alcalina não foi afetada estatisticamente pelo tratamento de animais ou pela exposição da cultura celular para 1,3 mM de etanol. Entretanto, os autores observaram que as células provenientes dos animais tratados com álcool e posteriormente cultivadas em meio livre do mesmo mostraram um aumento na atividade da fosfatase alcalina quando comparadas com as células do grupo controle, ou seja, aquelas em que os animais não foram tratados com álcool e posteriormente as células não foram expostas ao mesmo. Adicionalmente, as células que os animais não foram tratados com álcool, mas que receberam álcool através do meio de cultura apresentaram níveis menores de atividade da fosfatase alcalina que as células do grupo controle. Finalmente, as células provenientes dos animais tratados com álcool e cultivadas na presença de álcool e as células do grupo controle apresentaram níveis similares de atividade da fosfatase alcalina. Os autores, baseados nestes resultados, sugerem que a sensibilidade das células osteoblásticas à exposição ao etanol pode ser alterada dependendo do estágio de diferenciação celular e/ou tempo de exposição.

Em nossos resultados, o grupo controle, nos três períodos de análise, apresentou os menores valores de atividade de fosfatase alcalina em relação aos grupos álcool e isocalórico. Estes resultados convergem com os encontrados por Rosa et al., (2008), que mostraram um aumento na atividade da fosfatase alcalina em células cujos animais foram tratados com álcool, e em seguida foram expostas ao mesmo. Adicionalmente nossos resultados concordam com os resultados de Alves et al., (2010) em que os autores observaram um aumento gradativo da taxa de atividade de fosfatase alcalina até os 10 dias e em seguida uma diminuição também gradativa desta taxa.

Em estudos utilizando culturas osteogênicas, a mineralização é considerada como parâmetro funcional *in vitro*, refletindo o avanço da diferenciação das células (Hoemann et al., 2009). A

mineralização da matriz é o evento final da formação óssea (Rosa et al., 2008), sendo que a coloração de vermelho alizarina é comumente usada para detectar e quantificar o cálcio nesta matriz óssea neoformada (Hoemann et al., 2009). Cultura de células primárias removidas de calvária seguem um processo de dois estágios de desenvolvimento, incluindo uma fase de iniciação, período de uma a duas semanas, durante a qual as células proliferam lentamente, expressam atividade de fosfatase alcalina e outros genes específicos do osso, além de produzir e montar uma matriz de colágeno. Durante a fase de maturação, é observada a mineralização da matriz. A fase mineral geralmente depositada nestas culturas de osteoblastos é o fosfato de cálcio, que substitui a hidroxiapatita e é similar à observada no osso, cartilagem e dentes (Hoemann et al., 2009).

Em relação à quantificação de formações nodulares e matriz mineralizada, nosso estudo mostrou diferença estatística entre todos os grupos, sendo que o grupo álcool exibiu os maiores valores. Em contrapartida estudos prévios demonstraram que o etanol promove efeitos diretos na função do osteoblasto, inibindo a mineralização da matriz (Diamond et al., 1989; Turner et al., 1988; Brow et al., 2002; Gong, Wezeman, 2004; Rosa et al., 2008). Estes resultados controversos podem estar relacionados com o método de quantificação, uma vez que em nosso estudo foi utilizada a metodologia da extração do corante proposta por Gregory et al., (2004). O método de quantificação por extração do corante utilizando o ácido acético produz menor variabilidade de resultados, além de apresentar grande especificidade, já que detecta baixos níveis de incorporação de mineral (Gregory et al., 2004).

O mecanismo teratogênico do álcool ainda não está bem definido. Acredita-se que a ação do álcool é provavelmente multifatorial, com a participação de diferentes fatores, específicos dos estágios do desenvolvimento e do tipo de tecido afetado. Além disso, a sua ação pode ocorrer por mecanismos diretos e indiretos (Henderson et al., 1999).

Ao contrário da hipótese do experimento, os resultados sugerem que o consumo crônico de etanol durante a gestação não apresentou efeito antiproliferativo aos osteoblastos. Contudo, estudos prévios que administraram o álcool por longo tempo em ratos adultos obtiveram resultados negativos deste no tecido ósseo (Rocha, 2005; Souza, Rocha, 2009; Souza et al., 2009; Deco et al., 2010). Portanto, se o consumo crônico de álcool estivesse sido administrado por longo tempo e previamente ao período de gestação, condicionando o animal ao alcoolismo, os resultados deste presente estudo poderiam ser diferentes. Além disso, os efeitos antiproliferativos do álcool sobre os osteoblastos, observados nos trabalhos prévios de Friday e Howard (1991), Chavassieux et al. (1993) e Klein et al. (1996) ocorreram provavelmente devido à administração direta do álcool sobre as células, diferente da metodologia utilizada no nosso estudo.

A partir dos resultados obtidos, trabalhos futuros devem elucidar se o não condicionamento das ratas ao alcoolismo, portanto, o tempo de administração influenciou na resposta das células ósseas presentes nos filhotes. Vale ressaltar que o álcool para chegar aos osteoblastos dos fetos necessita de passagem placentária, e talvez este tempo ou a dose do álcool não tenha sido suficiente. Portanto, os estudos nesta área devem ser ampliados para que se possam obter resultados mais conclusivos.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que o álcool não interferiu negativamente no comportamento dos osteoblastos obtidos da calvária de recém-nascidos de ratas submetidas ao consumo crônico de etanol a 20% durante a gestação.

8 REFERÊNCIAS*

Alves HNP, Formigoni MLOS, Guerra ABG. Problemas associados ao uso de bebidas alcoólicas. In: Prado FC, Ramos J, Valle JR. Atualização terapêutica. São Paulo: Artes Médicas, 2003. p.1518 - 26.

Alves RDAM, Eijken M, Swagemakers S, Chiba H, Titulaer MK, Burgers PC, et al. Proteomic analysis of human osteoblastic cells: relevant proteins and functional categories for differentiation. *J Proteome Res.* 2010;9(9):4688-700.

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

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

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

Beloti MM, Rosa AL. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous treatment with dexamethasone. *Braz Dent J.* 2005;16(2):156-61.

Beloti MM, Martins Júnior W, Xavier SP, Rosa AL. In vitro osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(1):48-54.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Berg KM, Kunins HV, Jackson JL, Nahvi S, Chaudhry A, Harris KA, et al. Association between alcohol consumption and both osteoporotic fracture and bone density. *Am J Med.* 2008;121(5):406-18.

BRASIL. Lei 11.705 de 19/06/2008. Altera a Lei 9.503, de 23 de setembro de 1997, que "institui o Código de Trânsito Brasileiro", e a Lei 9.294, de 15 de julho de 1996, que dispõe sobre as restrições ao uso e à propaganda de produtos fumíferos, bebidas alcoólicas, medicamentos, terapias e defensivos agrícolas, nos termos do § 4º do art. 220 da Constituição Federal, para inibir o consumo de bebida alcoólica por condutor de veículo automotor, e dá outras providências. *Diário Oficial da União.* 20/06/2008. Disponível em <http://www6.senado.gov.br/legislacao/ListaPublicacoes.action?id=257318>.

Brienza RS, Stein MD. Alcohol use disorders in primary care. Do gender-specific differences exist? *J Gen Intern Med.* 2002;17(5):387-97.

Brown EC, Perrien DS, Fletcher TW, Irby DJ, Aronson J, Gao GG, et al. Skeletal toxicity associated with chronic ethanol exposure in a rat model using total enteral nutrition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;301(3):1132-8.

Chakkalakal DA, Novak JR, Fritz ED, Mollner TJ, Mcvicker DL, Lybarger DL, et al. Chronic ethanol consumption results in deficient bone repair in rats. *Alcohol Alcohol.* 2002;37(1):13-20.

Chakkalakal DA. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005;29(12):2077-90.

Chavassieux P, Serre CM, Vergnaud P, Delmas PD, Meunier PJ. In vitro evaluation of dose-effects of ethanol on human osteoblastic cells. *Bone and Mineral.* 1993;22(2):95-103.

Chen JR, Lazarenko OP, Haley RL, Blackburn ML, Badger TM, Ronis MJ. Ethanol impairs estrogen receptor signaling resulting in accelerated activation of senescence pathways, whereas estradiol attenuates the effects of ethanol in osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 2009;24(2):221-30.

Cunha P, Novaes MA. Neurocognitive assessment in alcohol abuse and dependence: implications for treatment. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004;26(Suppl 1):23-7.

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

Deco CP, Marchini AMPS, Bárbara MAM, Vasconcellos LMR, Rocha RF, Marchini L. Negative effects of alcohol and estrogen deficiency combination on osseointegration in a rat model. *J Oral Implantol.* 2010;10:10-5.

De Oliva MA, Maximiano WMA, Castro LMS, Silva PL, Fernandes RR, Ciancaglini P, et al. Treatment with a growth factor-protein mixture inhibits formation of mineralized nodules in osteogenic cell cultures grown on titanium. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(3):265-76.

Diamond T, Stiel D, Lunzer M, Wilkinson M, Posen S. Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. *Am J Med.* 1989;86(3):282-8.

Dyer AS, Buckendahl P, Sampson HW. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol.* 1998;16(4):337-41.

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

Fleming M, Mihic SJ, Harris RA. Etanol. In: Goodman AG. *As bases farmacológicas da terapêutica.* Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2010. p. 527-41.

Friday KE, Howard GA. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. *Metabolism.* 1991 Jun;40(6):562-5.

Galduróz JCF, Caetano R. Epidemiology of alcohol use in Brazil. *Rev Bras Psiquiatr.* 2004;26(Suppl 1):3-6.

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

Gallassi AD, Alvarenga PG, Andrade AG, Couttolenc BF. The cost of problems caused by alcohol abuse. *Rev Psiq Clín.* 2008;35:25-30.

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

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

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

Gong Z, Wezeman FH. Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004;28(3):468-79.

Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004;329(1):77-84.

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

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

Henderson GI, Chen JJ, Schenker S. Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus. *Front Biosci.* 1999;15(4):541-50.

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

Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol.* 2009;57(4):318-23.

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

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

Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. In: *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2009. p. 136-52.

Kachani AT, Brasiliano S, Hochgraf PB. The impact of alcohol on weight gain. *Rev Psiquiatr Clin.* 2008;35:21-4.

Kato H, Morishige WK, Rotchild I. A quantitative relationship between the experimentally determined number of conceptuses and corpus luteus activity in pregnant rats. *Endocrinology.* 1979;105(3):846-50.

Klein RF, Fausti KA, Carlos AS. Ethanol inhibits human osteoblastic cell proliferation. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996 May;20(3):572-8.

Klein RF. Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997 May;21(3):392-9.

Lane NE. Epidemiology, etiology and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol.* 2006;194(83):3-11.

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

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

Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. Mount Sinal J Med. 2000;67(1);84-94.

Lieber CS. Alcohol and hepatitis C. Alcohol Res Health. 2001;23(4):245-54.

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

Lieber CS. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the microsomal ethanol oxidizing system. J Hepatol. 2004;40(2)198-202.

Lieber CS. Metabolism of alcohol. Clin liver Dis. 2005;9(1):1-35.

Long L, Li Y, Wang YD, He QY, Li M, Cai XD, et al. The preventive effect of oral EGCG in a fetal alcohol spectrum disorder mouse model. Alcohol Clin Exp Res. 2010;34(11):1929-36.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193(1):265-75.

Lu Y, Cederbaum AI. CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. Free Rad Biol Med. 2008 Mar;44(5):723-38.

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

Maran A, Zhang M, Spelsberg TC, Turner RT. The dose-response effects of ethanol on the human fetal osteoblastic cell line. J Bone Miner Res. 2001;16(2):270-6.

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

Mezey E. Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *Am J Clin Nutr.* 1980 Dec;33(12):2709-18.

Micallef M, Lexis L, Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J.* 2007 Sep;24:6-27.

Miranda RC, Pietrzykowski AZ, Tang Y, Sathyan P, Mayfield D, Keshavarzian A, et al. MicroRNAs: Master regulators of ethanol abuse and toxicity?. *Alcohol Clin Exp Res.* 2010;Apr;34(4):575-87.

Mödder UI, Khosla S. Skeletal stem/osteoprogenitor cells: current concepts, alternate hypotheses, and relationship to the bone remodeling compartment. *J Cell Biochem.* 2008;103(2):393-400.

Moe SM. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care.* 2008;35(2):215-37.

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

Oliveira PT, Nanci A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. *Biomaterials.* 2004;25(3):403-13.

Organização Mundial da Saúde. *Classificação de transtornos mentais e de comportamento da CID-10.* 10. ed. Porto Alegre: Artes Médicas; 1997.

Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NHI Consensus Statement.* 2000 Mar 27-29;17(1):1-45. Review.

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

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

Ponce JC, Andreuccetti G, Jesus MGS, Leyton V, Muñoz DR. Alcohol in suicide victims in São Paulo. *Rev Psiq Clin*. 2008;35:13-6.

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

Rifas L, Towler DA, Avioli LV. Gestational exposure to ethanol suppresses *msx2* expression in developing mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94(14):7549-54.

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

Rosa AL, Beloti MM, van Noort R, Hatton PV, Devlin AJ. Surface topography of hydroxyapatite affects ROS17/2.8 cells response. *Pesqui Odontol Bras*. 2002;16(3):209-15.

Rosa AL, Beloti MM. TAK-778 enhances osteoblast differentiation of human bone marrow cells. *J Cel Biochem*. 2003;89(6):1148-53.

Rosa AL, Beloti MM. Development of the osteoblast phenotype of serial cell subcultures from human bone marrow. *Braz Dent J*. 2005;16(3):225-30.

Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RHC, Oliveira PT, Rosa AL. Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. *J Appl Toxicol*. 2008;28(2):205-11.

Rosa AL, Crippa GE, De Oliveira PT, Taba Júnior M, Lefebvre L-P, Beloti MM. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(5):472-81.

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

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

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

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

Shin SM, Cho IJ, Kim SG. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMP-activated protein kinase-mediated glycogen synthase kinase-3 β inhibition downstream of poly(ADP-ribose)polymerase-LKB1 pathway. *Pharmacol.* 2009;76(4):884-95.

Simão AMS, Beloti MM, Rosa AL, Oliveira PT, Granjeiro JM, Pizauro JM, et al. Culture of osteogenic cells from human alveolar bone: a useful source of alkaline phosphatase. *Cell Biol Int.* 2007;31(11):1405-13.

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

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

Souza DM, Ricardo LH, Prado MA, Prado FA, Rocha RF. The effect of alcohol consumption on periodontal bone support in experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(6):57-61.

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

Souza DM, Rocha RF. Low caloric value of ethanol itself increases alveolar bone loss in ligadure-induced periodontitis uin male rats. *Braz Oral Res.* 2009;23(4):450-6.

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

Stein G, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev.* 1993;14(4):424-42.

Szejnfeld VL. Osteoporose: diagnóstico e tratamento. São Paulo: Sarvier; 2000.

Talmage RV, Talmage DW. Calcium homeostasis: solving the solubility problem. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2006;6(4):402-7.

Toricelli P, Fini M, Giavaresi G, Borsari V, Rimondini L, Rimondini R, et al. Intermittent exposure to ethanol vapor affects osteoblast behaviour more severely than estrogen deficiency does in vitro study on rat osteoblasts. *Toxicology.* 2007;237(1-3):168-76.

Toricelli P, Fini M, Giavaresi G, Rimondini L, Tschon M, Rimondini R, et al. Chronic alcohol abuse and endosseous implants: linkage of in vitro osteoblast dysfunction to titanium osseointegration rate. *Toxicology.* 2008;243(1-2):138-44.

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

Turner RT, Aloia RC, Segel LD, Hannon KS, Bell NH. Chronic alcohol treatment results in disturbed vitamin D metabolism and skeletal abnormalities in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1988;12(1):159-62.

Turner RT. Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000;24(11):1693-701.

Wezeman FH, Emanuele MA, Emanuele NV, Moskal SF, Woods M, Suri M, et al. Chronic alcohol consumption during male rat adolescence impairs skeletal development through effects on osteoblast gene expression, bone mineral density, and bone strength. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999;23(9):1534-42.

World Health Organization. Global status report on alcohol. Geneva: WHO; 1999.

World Health Organization. Alcohol and injury in emergency departments: summary of the report from the WHO. France: WHO, Department of Mental Health and Substance Abuse, Department of Injuries and Violence Prevention; 2007.13p.

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

ANEXO A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

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



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **002/2010-PA/CEP**, sobre **“Influência do tratamento crônico de álcool em osteoblastos de ratos recém nascidos”** sob responsabilidades de **ISABEL CHAVES SILVA CARVALHO**, tendo como orientadora a Profa..Adjunto **ROSILENE FERNANDES DA ROCHA**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 10 de fevereiro de 2010



Profa.Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora