

ARIANE MOREIRA FERNANDEZ

**Análise biomecânica e densitometria óssea
de fêmures de ratos submetidos ao
alcoolismo crônico e consumo de fluoreto**

**ARAÇATUBA – SP
2011**

ARIANE MOREIRA FERNANDEZ

**Análise biomecânica e densitometria óssea
de fêmures de ratos submetidos ao
alcoolismo crônico e consumo de fluoreto**

Trabalho de Conclusão de Curso como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Bacharel em Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Araçatuba,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leda Maria
Pescinini Salzedas

**ARAÇATUBA – SP
2011**

Dedicatória

Dedico aos meus pais Angela e Eduardo, que são a luz da minha vida, meus amores. Acompanharam-me todos os instantes, me deram força para que eu continuasse a caminhada, por mais árdua que fosse.

À minha avó e minha irmã que mesmo distantes, sempre aconselhavam-me e ouviam-me nos momentos precisos.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela fé e esperança de cada dia, por me iluminar e guiar diante da vida.

À Prof.^a Leda Maria Pescinini Salzedas por me orientar, pela paciência, compreensão, confiança que depositou em mim e pelos ensinamentos científicos, filosóficos e as lições de vida.

Ao Prof. Mário Jefferson Quirino Louzada o qual dedicou várias tardes de seus afazeres para me auxiliar, sempre demonstrando muito carinho, respeito e atenção às minhas dúvidas, cedendo parte dos equipamentos do Laboratório de Biofísica do curso de Medicina Veterinária da UNESP.

Ao Marcelinho, técnico do Laboratório de Patologia e Propedêutica Clínica da UNESP, pelo companheirismo no laboratório, os conselhos, as conversas, e a dedicação com os animais no experimento.

Ao Pedro, técnico do Laboratório de Biofísica do curso de Medicina Veterinária da UNESP, pela simpatia e disponibilidade na utilização dos equipamentos.

Aos meus pais, em especial minha Mãe, que esteve presente em vários trabalhos, a qual se dedicou junto a mim para que tudo corresse da melhor maneira possível. Meus amor por vocês é incondicional.

Aos meus amigos pela amizade, por me guiarem, servindo sempre de auxílio para quando eu precisava.

E tudo ficou melhor desde o momento em que “você” voltou a minha vida. Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Penso que cumprir a vida seja simplesmente
compreender a marcha e ir tocando em frente.”*

Almir Sater e Renato Teixeira

FERNANDEZ, A. M. **Análise biomecânica e densitometria óssea de fêmures de ratos submetidos ao alcoolismo crônico e consumo de fluoreto**. 2011. 39f. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Resumo

A interferência do consumo crônico de álcool no metabolismo ósseo tem sido relatado por diversos estudos. O efeito da intoxicação aguda causada pelo álcool tem sido muito documentado, tanto em humanos quanto em animais experimentais. O objetivo dessa pesquisa foi investigar os efeitos do consumo crônico de aguardente de cana-de-açúcar e fluoreto de sódio em tecido ósseo de fêmur de ratos, avaliando biomecânica e densitometria óssea. No experimento foram utilizados 105 ratos, divididos em cinco grupos, conforme dieta líquida administrada: Grupo C controle (água), Grupo F (fluoreto), Grupo CA (água e álcool), Grupo FA (fluoreto e álcool), Grupo CF (fluoreto por 30 dias). Todos os animais receberam ração comercial. Nos Grupos C e F os animais foram tratados com água e fluoreto “*ad libitum*”, respectivamente, por um período de 90 dias. Os Grupos CA e FA receberam respectivamente, água e fluoreto por 30 dias antes da disponibilização de solução de aguardente de cana (40°GL) “*ad libitum*” em concentrações crescentes de 30% e 60% durante 20 dias, após os quais receberam aguardente de cana pura por 40 dias, até a eutanásia do animal. No grupo CF os animais receberam água por 60 dias, e a seguir fluoreto por 30 dias. Os animais foram eutanasiados após 3, 10 e 28 dias de completada a dieta, os fêmures foram dissecados, sendo os direitos submetidos à análise densitométrica no sistema DXA e os esquerdos submetidos ao ensaio biomecânico. Os valores obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para comparação entre os grupos. Na análise densitométrica foi verificada diferença estatística entre os grupos no Conteúdo Mineral Ósseo (CMO) e Densidade Mineral Óssea (DMO). A ordem decrescente de DMO foi: F, CF, C, FA, CA, sendo observada diferença estatística entre os grupos F e CA. O grupo F apresentou os maiores valores de CMO e DMO, e os grupos FA e CA apresentaram menores médias de CMO e DMO comparados aos C, F e CF. Na análise biomecânica foi avaliada a Força

máxima (Fmax) de ruptura total do terço médio (Tm) e da cabeça (Cb), utilizando o ensaio de flexão de 3 pontos (Tm) e de compressão (Cb) com a Máquina Universal de Ensaio mecânicos (EMIC DL 3000). Houve diferença significativa na Fmx apenas no Tm ($p < 0.05$) entre o grupo CF (maior Fmax) e os grupos CA e FA (menor Fmax). Pode-se concluir que há aumento da densidade óssea com o uso prolongado de NaF e que o uso crônico de álcool diminui os valores de CMO, DMO e parâmetro biomecânicos no terço médio, mesmo com o uso prévio de NaF. O uso de flúor por curto tempo aumenta os parâmetros biomecânicos.

Palavras-chave: Densidade óssea. Alcoolismo. Fluoretos. Densitometria. Biomecânica.

Fernandez, A. M. **Biomechanical analysis and bone densitometry in femurs of rats submitted to chronic alcoholism and consumption of fluoride.** 2011. 39f. Trabalho de conclusão de curso - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2011.

Abstract

The interference of chronic consumption of alcohol on bone metabolism has been reported in several studies. The effect of acute intoxication by alcohol has been widely documented, both in humans and in experimental animals. The aim of this study was to investigate the effects of chronic treatment with alcohol and sodium fluoride in bone tissue of the femur of rats, evaluating the biomechanic and bone densitometry. In the experiment, 105 rats were used, divided into five groups according to a liquid diet administered to them: Group C control (water), Group F (fluoride), Group CA (water and alcohol), Group FA (fluoride and alcohol), CF (Group fluoride for 30 days). All animals were fed commercial ration. In Groups C and F animals were treated with fluoride and water “ad libitum”, respectively, for a period of 90 days. Groups CA and FA were given, respectively, water and fluoride for 30 days before receiving a solution of sugar cane firewater (40° GL) “ad libitum” with increasing concentrations of 30% and 60% for 20 days, after which they received plain sugar cane firewater for 40 days until euthanasia of the animal. In the CF group the animals received water for 60 days and then fluoride for 30 days. The animals were killed after 3, 10 and 28 days of completion of the diet; their femurs were dissected, and the right ones were submitted to densitometry analysis on DXA system, while their left ones were submitted to biomechanical testing. Data were submitted to ANOVA and Tukey’s test for comparison between groups. Densitometric analysis showed difference between groups in bone mass content (BMC) and bone mineral density(BMD). The order of decreasing BMD was: F, CF, C, FA, CA, showing a statistical difference between groups F and CA. Group F showed the highest BMD and BMC, and CA and FA groups had lower averages in BMC and BMD compared to C, F and CF. In biomechanical analysis, it was

evaluated the maximum force (Fmax) of total collapse of the middle third (Tm) and the femur head (Cb), bending test using the 3-point (Tm) and compression (Cb) with the machine Universal Test Mechanical (EMIC DL 3000). There was a significant Fmx difference only in Tm($p < 0,005$) between the CF group(greater Fmax) and CA and FA groups (less Fmax). It can be concluded that there is increased bone density with prolonged use of NaF and the chronic alcohol use decreases the values of BMC, BMD and biomechanical parameters in the middle third, even in previous use of NaF. The use of fluoride for a short time increases the biomechanical parameters.

Keywords: Bone density. Alcoholism. Fluorides. Densitometry. Biomechanics.

Lista de Figuras

Figura 1	Fêmur posicionado e sob imersão em água no densitômetro	20
Figura 2	Aquisição da imagem	20
Figura 3	Dados obtidos após a análise	20
Figura 4	Ilustração mostrando a direção de aplicação da força no ensaio mecânico de flexão de 3 pontos aplicado no centro do osso (Tm) e de compressão aplicado na cabeça do fêmur (Cb)	22
Figura 5	Desenho esquemático da curva característica, Força x Deslocamento, obtida no ensaio de flexão de três pontos na máquina universal de ensaios EMIC®	22
Figura 6	Máquina Universal de Ensaios Emic utilizada em ensaios mecânicos, onde (a) é célula de carga e (b) o vão de apoio. A seta indica o osso fêmur no vão de apoio pronto para o início do ensaio biomecânico.	23

Lista de Tabelas

- Tabela 1: Média dos valores de CMO e DMO obtidas nos fêmures direitos de ratos de acordo com os grupos. 24
- Tabela 2: Médias de CMO e DMO dos grupos em cada tempo, e comparação após teste de Tukey. 25
- Tabela 3: Teste de Tukey para comparação de CMO e DMO do grupo F, de acordo com os três tempos de análise. 25
- Tabela 4: Valores da média das propriedades mecânicas força máxima (N), rigidez (10^3N/m) e resiliência (10^{-3}J) admitidas pelo terço médio de fêmures esquerdos de ratos de acordo com os grupos nos tempos de análise, estabelecendo a comparação dos grupos nos tempos de 3, 10 e 28 dias. 26
- Tabela 5: Valores da média das propriedades mecânicas força máxima (N), rigidez (10^3N/m) e resiliência (10^{-3}J) admitidas pelo terço médio de fêmures esquerdos de ratos de acordo com os grupos nos tempos de análise, comparando dentro do grupo. 27

Lista de Abreviaturas

cm = centímetro

cm² = centímetro quadrado

CMO = conteúdo mineral ósseo

DMO = densidade mineral óssea

DXA = Absortimetria de raios X em duas energias

Fmax = força máxima

g/cm² = grama por centímetro quadrado

°GL = graus Gay-Lussac

IGF-I = Fator I de crescimento semelhante à insulina

J = Joule

kVp = quilovoltagem –pico

ml/l = mililitro por litro

mg/l = miligrama por litro

mm = milímetro

NaF = fluoreto de sódio

N = Newton

N/m = Newton por metro

OMS = Organização Mundial da Saúde

PTH = Hormônio da paratireóide

ppm = partes por milhão

® = marca registrada

TCQ = tomografia computadorizada quantitativa

μA = microamper

% = por cento

Sumário

1	Introdução	13
2	Proposição	17
3	Material e Método	18
4	Resultados	24
5	Discussão	28
6	Conclusão	32
	Referências	33
	Anexos	37

1 Introdução

Alcoolismo é uma doença de natureza complexa, na qual o álcool se torna um fator determinante sobre as causas psicossomáticas preexistentes no indivíduo e cujo tratamento é preciso recorrer a processos profiláticos e terapêuticos de grande amplitude (OMS, 1970). Transtornos relacionados a substâncias geralmente causam prejuízos importantes e complicações graves, resultando em deterioração da saúde geral do indivíduo, além de produzir efeitos negativos nos contextos pessoal, social e profissional (RANGÉ; MARLATT, 2008).

De acordo com dados de Alencastro, 2011, o alcoolismo foi apontado pelo Ministério da Saúde como um dos principais responsáveis pelas mortes decorrentes de doenças do aparelho circulatório e aparece também associado à histórias de violência. Um estudo inédito da Universidade Federal de São Paulo, realizado em 7.939 domicílios de 108 cidades brasileiras, revela que houve violência em 35% das residências. Em 17,4% dos casos, o abuso do álcool estava presente. A maioria absoluta dos agressores alcoolizados (90%) são homens, e 65% das vítimas, mulheres. Um quarto dos registros foi de violência física e 5%, de agressões com armas. O álcool é a droga mais associada à violência. Favorece a violência, rebaixa a crítica e aumenta a agressividade.

O consumo excessivo e prolongado de álcool, além de estar relacionado a várias patologias comportamentais, causa uma multiplicidade de anormalidades bioquímicas, fisiológicas e clínicas. Segundo Larato, 1972 *apud* Tirapelli *et al.*, 2001, a ingestão crônica de etanol produz uma variedade de modificações sistêmicas em órgãos vitais e no sistema digestivo incluindo cirrose hepática, hipoproteïnemia, ascite, anemia macrocítica, deficiências vitamínicas e alterações neurológicas tais como déficits cognitivos, déficit de memória grave e alterações degenerativas no cerebelo (RANGÉ; MARLATT, 2008). Embora o alcoolismo tenha sido um dos maiores problemas médicos e sociais de quase todas as sociedades no século passado, a apreciação de que o abuso do álcool possa levar a doenças ósseas é atual (BUCHAIM *et al.*, 2004).

A ingestão crônica de álcool pode provocar alterações estruturais em vários tecidos (FAUSTINO et al, 2003), inclusive no tecido ósseo, podendo levar à osteoporose. A osteoporose é uma doença multifatorial caracterizada, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1970), pela baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo com consequente surgimento de fragilidade e susceptibilidade a fraturas após mínimos traumas. O consumo crônico é considerado um redutor da formação óssea nos processos de cicatrização em animais (ELMALI et al., 2002) além de inibir a proliferação de células osteoblásticas e sua atividade *in vivo* (DYER et al., 1998). Dessa forma, o alcoolismo é considerado uma causa secundária da osteoporose, levando conseqüentemente à ocorrência de fraturas.

O osso é um tecido dinâmico e que se remodela por toda a vida do indivíduo. A função mecânica deste órgão inclui a proteção de estruturas vitais e suporte para os tecidos moles. Entretanto, o osso contém uma matriz mineralizada, a matriz óssea, que funciona como reserva de íons, principalmente cálcio e fosfato para a manutenção da homeostase sérica. É em consequência desta função orgânica que o osso precisa ser continuamente remodelado. A remodelação óssea é, portanto, o mecanismo de manutenção do metabolismo ósseo, apresentado por um equilíbrio entre os processos de reabsorção e formação óssea, realizados por células ósseas especializadas (SOUZA, 2010).

Com relação aos efeitos do etanol em tecido ósseo, alguns autores acreditam que o uso crônico do álcool pode interferir no metabolismo ósseo e causar osteoporose (GONZALEZ-CALVIN et al., 1993, NISHIGUCHI et al., 2000) pela inibição de células osteoblásticas (DYER et al., 1998) ou pelo aumento da reabsorção osteoclástica (GONZALEZ-CALVIN, 1993; TREVISIOL et al., 2007).

Desde o momento em que o fluoreto de sódio (NaF) começou a ser adicionado a água de beber em 1945, debate-se sua influência nos ossos humanos

Há diversos trabalhos na literatura que relatam o efeito do fluoreto sobre a estrutura e o metabolismo do osso, no tratamento da osteoporose em mulheres pós-menopáusicas. A maior suscetibilidade à osteoporose entre as mulheres mais idosas está associada intimamente à queda da produção de estrogênio que acompanha a menopausa (MELLO; GOMIDE, 2005). A terapia com

fluoreto tem sido usada para diminuir o risco de fraturas na osteoporose, pelo aumento da massa óssea trabecular (ZIEGLER, 1991). Entretanto sua utilização em doses altas em períodos prolongados parece causar alguns efeitos indesejáveis, como hipersensibilidade dentária, fluorose esquelética (OPINYA; IMALINGAT, 1991), irritação gastrointestinal, tendinites e dores das articulações (MELLO; GOMIDE, 2005). Ratas ovariectomizadas têm sido utilizadas como modelo animal de osteoporose experimental, pois fornecem dados fundamentais semelhantes aos observados no esqueleto adulto pós-menopáusico. Embora não haja um animal que atenda a todos os requisitos de modelo ideal, a rata tem sido amplamente utilizada e aprovada, pois, como a mulher após a menopausa, desenvolve osteopenia após ovariectomia (MELLO; GOMIDE, 2005). O tratamento de ratas ovariectomizadas com fluoreto resultou em um aumento de resistência à compressão do fêmur, mas também em uma maior fragilidade à flexão.

Jiang et al. (1996) estudou o efeito do fluoreto de sódio com reposição hormonal em ratas ovariectomizadas e verificou não haver diferença entre o grupo tratado e não tratado quanto ao grau de mineralização do osso, e que o fluoreto de sódio em baixas concentrações por um longo período aumentou a massa óssea e as propriedades geométricas no osso cortical e trabecular, mas não aumentou a força vertebral nem a femural. Já segundo Sogaard et al. (1997), o tratamento com fluoreto não foi capaz de recuperar a perda da força óssea causada pela ovariectomia. Não há, portanto, um consenso sobre a exata ação dos fluoretos na osteoporose.

Há evidências de que a dieta de humanos enriquecida com flúor diminui a desmineralização dos ossos - a osteoporose - dos indivíduos mais velhos. Trabalhos realizados por alguns pesquisadores relacionam o flúor com o aumento de massa óssea; necessitam-se, portanto, mais estudos sobre a relação desse agente terapêutico com a resistência óssea (MELLO; GOMIDE, 2005).

As propriedades mecânicas definem o comportamento de um material quando sujeito aos esforços de natureza mecânica, e correspondem às propriedades que determinam a sua capacidade de transmitir e resistir aos esforços aplicados, sem romper ou sem que se produzam deformações incontroláveis. Os ensaios de flexão são simples e fornecem parâmetros

fundamentais das propriedades mecânicas dos ossos. O ensaio consiste em colocar o fêmur apoiado e aplicar uma força na região central de sua cabeça, e assim estabelecer a curva força versus deslocamento. Dentre as variáveis calculadas temos a força máxima admitida, a rigidez e a resiliência (CHIAVERINI, 1979).

As propriedades biomecânicas ósseas em ratos em fase de crescimento também são afetadas de forma negativa pela exposição crônica ao álcool (HOGAN et al, 1997). Estudos sugerem também que, comparado ao osso adulto, perdem-se mais ossos corticais em ratos adolescentes expostos ao álcool, revelando o fato que o crescimento ósseo, e não a remodelagem óssea, é a principal atividade do esqueleto em seu desenvolvimento. Uma questão importante acerca dos efeitos do álcool no osso adolescente é se o esqueleto em desenvolvimento pode superar os danos causados pelo álcool, ou se o consumo alcoólico causa um déficit duradouro na massa ou na força óssea (LAUING et al, 2008).

Considerando-se a presença de alterações ósseas resultantes do consumo crônico de álcool e a possibilidade de diminuição dos riscos de fratura na osteoporose com uso de fluoreto, e sendo ainda controversa a ação destas substâncias, faz-se necessária a correlação dos efeitos no tecido ósseo da administração das mesmas. O amplo espectro de ação do álcool associado ao consumo abusivo de aguardente de cana-de-açúcar no Brasil torna relevante o estudo dos seus efeitos em tecido ósseo proposto neste experimento. O Brasil possui uma prevalência de aproximadamente 6% para o alcoolismo (ALMEIDA e COUTINHO, 1993), ocupando o 3º lugar mundial no consumo de destilados, com uma média anual de 11 litros de aguardente por habitante. Infelizmente há uma carência de trabalhos na literatura especializada correlacionando o consumo crônico de álcool com alterações do tecido ósseo. O fluoreto de sódio foi o primeiro dos agentes anabólicos a serem utilizados no tratamento da osteoporose pós-menopausa, porém não há relatos de sua atuação em ratos submetidos ao alcoolismo crônico. Por estas razões nos propomos a realizar um estudo investigativo dos parâmetros biomecânicos e da densidade mineral no tecido ósseo de animais submetidos ao alcoolismo e consumo de fluoreto.

2 Proposição

O objetivo deste projeto foi realizar a análise densitométrica óssea e de propriedades mecânicas em fêmures de ratos submetidos ao consumo de fluoreto de sódio e ao consumo crônico de álcool, com e sem consumo prévio de fluoreto.

3 Material e Método

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP (Protocolo 2010-002882).

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

3.1 Indução ao alcoolismo crônico

A indução ao alcoolismo foi efetuada nos grupo CA e FA, que receberam, respectivamente, água e flúor por 30 dias previamente à indução. Os animais deste grupo receberam ração comercial e solução de aguardente de cana-de-açúcar a 40°GL (Nome comercial: Cachaça 61- fabricado por Missiato Ind. e Com.- Santa Rita do Passa Quatro- S.P.) “*ad libitum*” em concentrações crescentes da seguinte forma: nos primeiros 10 dias os animais receberam solução de aguardente de cana-de-açúcar a 30%, nos 10 dias subseqüentes, solução de aguardente a 60%, e a partir do 21º dia, a aguardente pura por um período de 40 dias, continuado até o sacrifício.

Para a melhor seleção dos animais e com a finalidade de conseguir um grupo de trabalho homogêneo, a cada 3 dias, foram controlados o peso, o consumo de água e de solução de aguardente de cana-de-açúcar, além da quantidade de ração comercial dos ratos. Quando detectada discrepância entre um destes consumos, o animal foi eliminado do experimento.

Os grupos foram submetidos ao seguinte protocolo:

- a) Grupo C controle: Os animais foram tratados com ração comercial e água “*ad libitum*” durante todo o experimento.
- b) Grupo F: Os animais foram tratados com ração comercial e receberam fluoreto na água de beber na concentração de 30 ppm sob a forma de NaF durante todo o experimento.

c) Grupo CF: Os animais foram tratados com ração comercial e água “*ad libitum*” por 60 dias, e a seguir receberam fluoreto na água de beber na concentração de 30 ppm, sob a forma de NaF, por 30 dias, sendo mantido até o sacrifício.

d) Grupo CA: Os animais foram tratados com ração comercial e água “*ad libitum*” por um período de 30 dias, e a seguir submetidos à indução do alcoolismo, recebendo aguardente pura até o sacrifício.

e) Grupo FA: Os animais foram tratados com ração comercial e receberam fluoreto na água de beber na concentração de 30ppm, sob a forma de NaF, por 30 dias, e a seguir submetidos à metodologia do alcoolismo, recebendo aguardente pura até o sacrifício.

Os animais, após o período de tratamento de 90 dias, foram sacrificados nos tempos de 3, 10 e 28 dias, por dose excessiva de anestésico (Cloridrato de Xilazina - 0,03ml/100g peso corporal - e Cloridrato de Ketamina - 0,07ml/100g de peso corporal), e os fêmures removidos cirurgicamente e dissecados. Os fêmures do lado direito foram fixados em formol a 10% por 24 horas e submetidos à análise densitométrica no sistema DXA. Os fêmures do lado esquerdo foram congelados para posterior análise biomecânica.

3.2 Densitometria óssea

Os fêmures do lado direito foram removidos, dissecados e fixados em formol a 10% por 24 horas. As peças foram submetidas à análise densitométrica em um densitômetro de dupla emissão de raios X, modelo DPX-Alpha, Lunar®. Foi utilizado o programa computacional para exames em pequenos animais. As aquisições de imagem foram realizadas com os fêmures na mesma posição, imersas sob profundidade de 2 cm de água (para simular os tecidos moles) e selecionadas as opções: apendicular; osso Tipo 1; modo alta resolução; 76 kVp; 150 µA; colimação no ajuste fino; área de tamanhos padronizados em 40 mm de largura e 20 mm de comprimento. Conforme a recomendação do fabricante, o aparelho foi calibrado diariamente com um fantoma fornecido pelo próprio fabricante. (Figura 1 e 2).

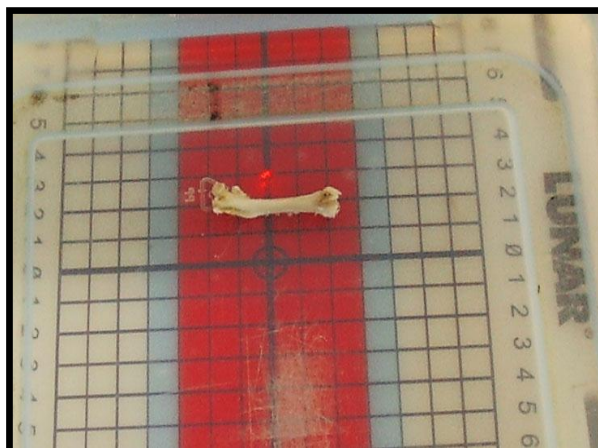


Figura 1: Fêmur posicionado e sob imersão em água no densitômetro.

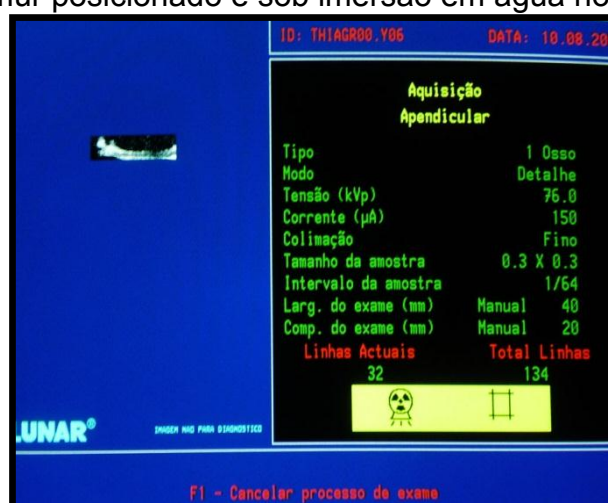


Figura 2: Aquisição da imagem.

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



Figura 3: Dados obtidos após a análise.

3.2 Ensaio mecânico

Os fêmures esquerdos foram retirados e separados das partes moles circundantes, envolvidos em gaze umedecida em soro fisiológico e estocados em “freezer” a -20°C . Na ocasião dos ensaios mecânicos, os ossos foram retirados do “freezer” e mantidos algumas horas em temperatura ambiente, até atingir o equilíbrio térmico. Para os ensaios mecânicos foi utilizada máquina universal de ensaio EMIC, modelo DL 3000, com carga aplicada a uma velocidade de 5 mm/min. O registro de força e deslocamento foi realizado pelo sistema computacional pertencente à máquina. O equipamento é de propriedade da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, alocada no Departamento de Materiais Dentários e Prótese do Curso de Odontologia.

Dentre as variáveis calculadas temos a força máxima admitida, a rigidez e a resiliência. Força máxima (F_{max}) é o maior valor de força observada no ensaio mecânico. Rigidez é definida pela deformação observada no corpo, em resposta à força aplicada. Quanto maior a rigidez, menor a deformação resultante da aplicação de uma tensão. É obtida através da inclinação da curva força *versus* deformação na fase elástica da curva. Resiliência é a energia absorvida pelo corpo na fase elástica e é obtida calculando-se a área sob a curva força *versus* deformação.

Foi analisada a força máxima (F_{max}) da ruptura total da cabeça (Cb) e terço médio (Tm) no fêmur de rato, além da rigidez e resiliência obtidas a partir do ensaio de flexão de 3 pontos no Tm e de compressão na Cb (Figura 4).

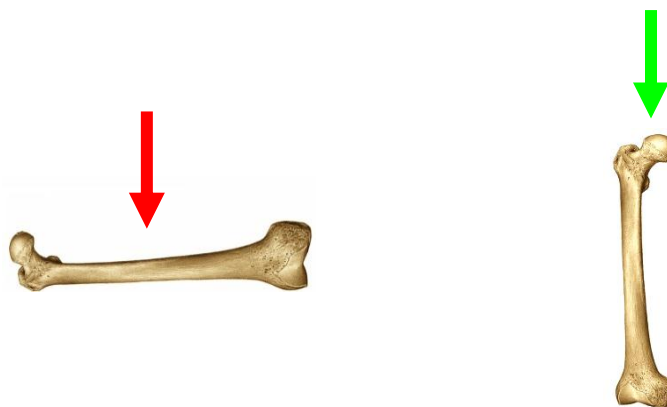


Figura 4 – Ilustração mostrando a direção de aplicação da força no ensaio mecânico de flexão de 3 pontos aplicado no centro do osso (Tm) e de compressão aplicado na cabeça do fêmur (Cb).

Para análise biomecânica foi determinada, através da curva de força X deslocamento (Figura 5) a força máxima admitida pelo fêmur, a rigidez (calculada pela inclinação da curva, na fase elástica) e a resiliência (energia absorvida pelo osso no ensaio, calculada pela área sob a curva força x deslocamento) variáveis que expressam características mecânicas do osso tal como resistência óssea. No teste de flexão de 3 pontos utilizado no Tm a distância de vão de apoio foi de 20 mm e no ensaio de compressão da Cb o fêmur foi fixado na vertical, e a célula de carga utilizada foi de 2000 N. (Figura 6)

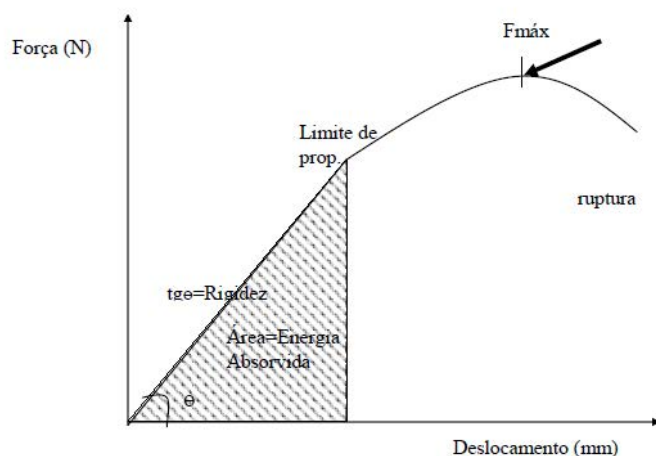


Figura 5 - Desenho esquemático da curva característica, Força x Deslocamento, obtida no ensaio mecânico na máquina universal de ensaios EMIC®.

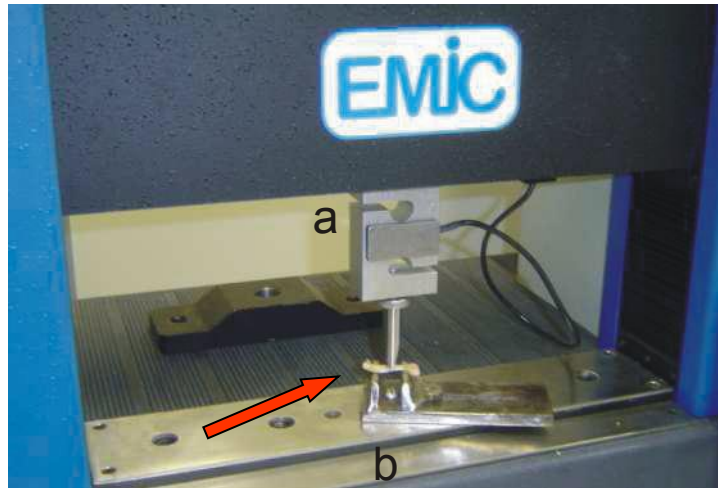


Figura 6. Máquina Universal de Ensaio Emic utilizada em ensaios mecânico de flexão, onde (a) é célula de carga e (b) o vão de apoio. A seta indica o osso fêmur no vão de apoio pronto para o início do ensaio biomecânico.

Os resultados da análise densitométrica e do ensaio mecânico foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de *Tukey* para comparação entre os grupos, nos três tempos, em cada uma das variáveis densitométricas (CMO e DMO) e biomecânicas (força máxima, rigidez e resiliência). Em todas as análises foi usado o valor de 5% como nível de significância.

4 Resultados

Análise Densitométrica

Na análise densitométrica foram analisados os valores de CMO e DMO obtidos nos fêmures inteiros. Ao comparar o **CMO entre os grupos** (considerando os três tempos juntos) foi verificada diferença estatística significativa e, conforme demonstrado na Tabela 1, os grupos C, F e CF foram similares entre si e diferiram estatisticamente dos grupos FA e CA (similares entre si). Na comparação da **DMO entre os grupos** foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos F e CA, sem variação significativa dos grupos em relação ao grupo Controle (Tabela 1).

Tabela 1. Média dos valores de CMO e DMO obtidas nos fêmures direitos de ratos de acordo com os grupos.

Grupos	CMO(g) [#]	DMO(cm ² /g) ^{\$}
C	0.386 ^a	0.206 ^{c,d}
F	0.426 ^a	0.223 ^c
CA	0.309 ^b	0.186 ^d
FA	0.317 ^b	0.193 ^{c,d}
CF	0.407 ^a	0.211 ^{c,d}

*alpha: 0,05

[#]Diferença Mínima significativa: 0.0532; ^{\$}Diferença mínima significativa:0.023

Ao comparar o **CMO entre os grupos** (considerando os três tempos separadamente) foi verificada diferença estatística significativa aos 10 e 28 dias e na **DMO** aos 10 dias, conforme demonstrado na Tabela 2, sendo os valores submetidos ao teste de Tukey para comparação de pares ($P < 0.05$).

No CMO houve diferença significativa entre os grupos aos 10 e 28 dias, sendo o grupo F com maior valor em ambos tempos. Aos 10 dias o grupo CA apresentou o menor valor e aos 28 dias foi o grupo FA, porém sem diferença estatística entre eles em ambos os tempos. Em ambos os tempos (10 e 28 dias) os grupos F e CA apresentaram diferença estatística significativa, sendo que aos 28 dias o grupo F também apresentou diferença estatística significativa do grupo CA. Portanto, aos 28 dias o resultado foi igual ao observado na análise dos 3 tempos juntos (Tabela 1) em que os grupos C, F e CF foram similares entre si e diferiram estatisticamente dos grupos FA e CA (similares

entre si). Em relação a DMO houve diferença aos 10 dias entre os grupos, sendo o grupo F com maior valor e o grupo CA com menor valor, com diferença estatística entre eles. Não houve variação significativa dos grupos em relação ao grupo C. Esta análise foi igual àquela observada ao avaliar a DMO de todos os tempos juntos (Tabela 1). Em relação a Área houve diferença aos 3 e 28 dias entre o grupo CA, FA e o grupos CF (maior valor). No tempo 28 dias, os grupos CA, FA também foram diferentes dos grupos C e F (Tabela 2).

Tabela 2- Médias de CMO e DMO dos grupos em cada tempo, e comparação após teste de Tukey.

Grupos	Fêmur inteiro								
	Conteúdo Mineral Ósseo (g)(CMO)			Área (cm ²)			Densidade Mineral óssea (cm ² /g)(DMO)		
	3 dias	10 dias	28 dias*	3 dias*	10 dias	28 dias*	3 dias	10 dias*	28 dias
C	0,391	0,351 ^{A,B}	0,415 ^A	1,826 ^{A,B}	1,782	1,978 ^A	0,215	0,195 ^{A,B}	0,210
F	0,412	0,397 ^B	0,469 ^A	1,846 ^{A,B}	1,880	1,996 ^A	0,223	0,212 ^B	0,235
CA	0,325	0,276 ^A	0,326 ^B	1,602 ^B	1,733	1,622 ^B	0,198	0,159 ^A	0,200
FA	0,312	0,321 ^{A,B}	0,318 ^B	1,590 ^B	1,712	1,631 ^B	0,196	0,188 ^{A,B}	0,197
CF	0,414	0,377 ^B	0,429 ^A	1,975 ^A	1,866	1,937 ^A	0,210	0,202 ^{A,B}	0,222

*P<0,05

Na comparação do **CMO e DMO dentro de cada grupo**, nos tempos 3-10-28 dias, foi verificada diferença estatística significativa apenas dentro do grupo F (P=0.0374 e P=0.0413 respectivamente). Os dados do grupo F foram submetidos ao teste de Tukey (P< 0,05), sendo verificada diferença significativa no **CMO e DMO** entre os grupos 10 e 28 dias, mas estes sem diferença do grupo 3 dias (Tabela 2). Não houve diferença na comparação de **área dentro de cada grupo**.

Tabela 3 – Teste de Tukey para comparação de CMO e DMO do grupo F, de acordo com os três tempos de análise.

DEXA Femur inteiro			
Conteúdo de massa óssea (g)(CMO)		Densidade Mineral óssea (cm ² /g)(DMO)	
Entre tempos	Média*	Entre tempos	Média*
3 DIAS	0,412 ^{A,B}	3 DIAS	0,223 ^{A,B}
10 DIAS	0,397 ^A	10 DIAS	0,212 ^A
28 DIAS	0,469 ^B	28 DIAS	0,235 ^B

*p<0,05

Análise Biomecânica

Na análise biomecânica da **Cb** (utilizando ensaio de compressão) não foi verificada diferença estatística significativa entre os grupos (nos tempos de 3, 10 e 28 dias) e também sem diferença dentro de cada grupo nos tempos 3, 10 e 28 dias considerados os parâmetros analisados: Fmax, rigidez e resiliência.

Utilizando o ensaio de flexão de 3 pontos, ao comparar a análise biomecânica do **Tm entre os grupos** (considerando os três tempos separadamente) foi verificada diferença estatística significativa na Fmax e rigidez nos três tempos analisados (3, 10 e 28 dias) e, no teste de resiliência houve diferença entre os grupos aos 3 e 28 dias (Tabela 4).

Tabela 4. Valores da média das propriedades mecânicas força máxima (N), rigidez (10^3N/m) e resiliência (10^{-3}J) admitidas pelo terço médio de fêmures esquerdos de ratos de acordo com os grupos nos tempos de análise, estabelecendo a comparação dos grupos nos tempos de 3, 10 e 28 dias.

Grupos	Força Máxima (N)			Rigidez (10^3N/m)			Resiliência (10^{-3}J)		
	3 dias	10 dias	28 dias	3 dias	10 dias	28 dias	3 dias	10 dias	28 dias
C	211,55 ^a	166,17 ^{cd}	184,86 ^e	521,03 ^a	446,09 ^c	519,33 ^e	120,76 ^{ab}	66,61	97,49 ^e
F	171,93 ^{ab}	173,83 ^{cd}	178,06 ^e	397,24 ^b	465,85 ^c	436,65 ^c	108,78 ^a	97,48	67,54 ^{e,f}
CA	152,54 ^b	137,21 ^d	147,56 ^f	290,8 ^b	144,83 ^d	170,87 ^f	71,84 ^a	71,67	80,52 ^{e,f}
FA	151,74 ^b	144,94 ^{cd}	119,4 ^f	382,9 ^b	155,95 ^d	180,96 ^f	103,41 ^a	83,02	54,91 ^f
CF	213,62 ^a	179,79 ^c	187,48 ^e	524,67 ^a	490,88 ^c	515,08 ^e	170,51 ^b	99,78	104,42 ^e

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Letra minúsculas comparação entre grupos.

Conforme demonstrado na Tabela 4, na análise da Fmax houve diferença estatística nos 3 tempos de análise: aos 3 dias entre os grupos CA,FA e os grupos CF, C sendo que o grupo F não apresentou diferença dos demais grupos; aos 10 dias houve diferença entre os grupos CF e CA; aos 28 dias houve diferença entre os grupos C,CF,F e os grupos CA,FA. Na análise da Rigidez houve diferença estatística nos 3 tempos: aos 3 dias entre os grupos C,CF e os grupos F,CA e FA; aos 10 e 28 dias entre os grupos C,CF,F e os grupos CA,FA. No teste de Resiliência houve diferença nos tempos de 3 e 28 dias: aos 3 dias entre o grupo CF e os grupos F,CA,FA; aos 28 dias entre o grupo FA e os grupos CF, C.

Na comparação do **Tm dentro de cada grupo**, nos tempos 3-10-28 dias, foi verificada diferença estatística significativa em alguns grupos (Tabela 5). Os grupos C e CF apresentaram diferença entre os tempos na análise de

Fmax e resiliência. O grupo CA apresentou diferença entre os tempos no teste de rigidez. O grupo FA apresentou diferença entre os tempos na Fmax, rigidez e resiliência.

Tabela 5. Valores da média das propriedades mecânicas força máxima (N), rigidez (10^3N/m) e resiliência (10^{-3}J) admitidas pelo terço médio de fêmures esquerdos de ratos de acordo com os grupos nos tempos de análise, comparando dentro do grupo.

Grupos	Força Máxima (N)			Rigidez (10^3N/m)			Resiliência (10^{-3}J)		
	3 dias	10 dias	28 dias	3 dias	10 dias	28 dias	3 dias	10 dias	28 dias
C	211,55 ^A	166,17 ^B	184,86 ^{AB}	521,03	446,09	519,33	120,76 ^A	66,61 ^B	97,49 ^{AB}
F	171,93	173,83	178,06	397,24	465,85	436,65	108,78	97,48	67,54
CA	152,54	137,21	147,56	290,8 ^A	144,83 ^B	170,87 ^B	71,84	71,67	80,52
FA	151,74 ^A	144,94 ^{AB}	119,4 ^B	382,9 ^A	155,95 ^B	180,96 ^B	103,41 ^A	83,02 ^{AB}	54,91 ^B
CF	213,62 ^A	179,79 ^B	187,48 ^{AB}	524,67	490,88	515,08	170,51 ^A	99,78 ^B	104,42 ^B

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Letras maiúsculas comparação dos tempos do mesmo grupo.

Conforme demonstrado na Tabela 5, os grupos C e CF apresentaram diferença na Fmax e resiliência entre os tempos 3 e 10 dias, havendo redução nos valores de Fmax aos 10 dias. Aos 28 dias houve elevação dos valores não havendo diferença daqueles observados aos 10 dias e ao valor inicial de 3 dias. Este mesmo padrão de variação (redução dos valores aos 10 dias) foi observado na rigidez destes grupos C e CF, porém sem diferença estatística significativa entre os tempos. O grupo FA apresentou diferença estatística significativa entre os tempos na Fmax, rigidez e resiliência. Na Fmax e resiliência houve diferença entre os tempos 3 e 28 dias, havendo redução nos valores com o passar do tempo. No teste de rigidez houve redução significativa dos valores aos 10 dias (diferença significativa dos valores aos 3 dias), e aos 28 dias houve elevação dos valores mas sem diferenças dos 10 dias. O grupo CA apresentou diferença estatística significativa entre os tempos de 3 dias e 10/28 dias, sendo estes últimos com valores inferiores ao inicial.

5 Discussão

O uso prolongado e excessivo de álcool causa alterações no mecanismo de remodelação óssea em nível celular, modificando seu conteúdo mineral e podendo causar osteopenia e osteoporose, que são associados ao aumento dos riscos de incidência de fratura (DYER et al., 1998). A osteoporose é uma doença multifatorial caracterizada pela baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo com conseqüente surgimento de fragilidade e susceptibilidade a fraturas após mínimos traumas (OMS, 1970) e apesar de existir inúmeras pesquisas, o mecanismo com o qual isto ocorre ainda não é bem esclarecido (SOUZA, 2010).

Estudos mostram que o uso prolongado de álcool reduz significativamente o número de osteoblastos inibindo a proliferação e atividade destas células, estimula a síntese de PTH, que é o principal hormônio responsável pela homeostase de cálcio em mamíferos. O PTH estimula osteoclastos a reabsorver o osso (CHEN et al., 2001). Em uma pesquisa sobre os efeitos do alcoolismo crônico no processo de remodelação óssea *in vivo* utilizando tíbias de ratos alimentados com dieta líquida de etanol a 35% durante 6 semanas, demonstrou-se significativa redução do número e atividade dos osteoblastos observados por meio da histomorfometria. (DYER et al., 1998).

As alterações no metabolismo ósseo após o uso prolongado do álcool pode ser detectado por vários métodos, entre eles a avaliação radiográfica densitométrica. Neste estudo optamos pela utilização da absorptimetria de raios X em duas energias (DXA), método não invasivo que vem sendo utilizado como recurso mais acessível na avaliação óssea (PETERSEN et al., 2000; BERTIN et al., 1998).

Muitos estudos em humanos tentam correlacionar a incidência de fraturas em comunidades que adotam a fluoretação da água no abastecimento público comparando com comunidades sem fluoretação. Entretanto, estes estudos não têm controle sobre variáveis que estão fortemente ligadas com o aumento do risco de fratura do osso como estrogênio, fumo, peso corporal e uso abusivo de álcool (PHIPPS et al., 2000). Porém, não existe dúvida que doses farmacológicas de flúor estimulam a formação óssea e aumentam significativamente a DMO. O aumento na formação óssea foi relacionado ao

aumento no número de osteoblastos, porém, tal mecanismo ainda não foi completamente elucidado (PHIPPS et al., 2000).

O osso é um tecido complexo e sua resistência depende não somente da quantidade mas também da qualidade tecidual. Esta qualidade é caracterizada pela geometria e forma dos ossos, microarquitetura das trabéculas, conteúdo mineral e colágeno. As propriedades mecânicas do osso refletem as propriedades de seus constituintes, da maneira como eles estão arranjados e como interagem (BROULIK et al., 2010). As propriedades mecânicas definem o comportamento de um material quando sujeito aos esforços de natureza mecânica, e correspondem às propriedades que, num determinado material, determinam a sua capacidade de transmitir e resistir aos esforços aplicados, sem romper ou sem que se produzam deformações incontroláveis (CHIAVERINI, 1979). A fragilidade óssea pode ser estimada por testes biomecânicos como o de flexão-compressão tanto na cabeça do fêmur, que é o local de maior fratura em humanos, quanto na região metafisária do osso (TURNER; BURR, 1993; BROULIK et al., 2010). Neste estudo, a análise biomecânica foi aplicada carga à cabeça femoral (compressão axial) e no meio da diáfise do fêmur (flexão) em máquina de ensaio universal (EMIC DL 3000). Em nossos resultados, na análise biomecânica da Cb não houve diferença estatística significativa entre os grupos e entre tempos nos parâmetros analisados: Fmx, rigidez e resiliência. O método convencional para testar mecanicamente o terço proximal do fêmur de ratos é baseado na aplicação de uma força axial na cabeça do fêmur, entretanto, em ossos osteoporóticos, a maioria das fraturas nesse local é resultante de momentos fletores elevados, gerados por forças laterais ou forças torcionais (VICENTINI, 2006).

Neste trabalho verificamos que o CMO do fêmur foi inferior nos grupos submetidos ao alcoolismo crônico quando comparados ao controle, indicando uma perda no conteúdo mineral (Tabelas 1 e 2), verificado também por Broulik et al. (2010) e Nyquist et al. (2002). Na análise da DMO os grupos C, F e CF foram similares entre si, assim como os grupos C, FA e CA entre si, sendo que o consumo de flúor e de álcool promoveram alterações na densidade óssea (Tabela 2), porém com diferença significativa apenas entre os grupos que tiveram o consumo exclusivo de uma das substâncias por longo período de tempo (Grupos F e CA). Assim, apesar de variações numéricas de DMO entre

os grupos, não houve variação significativa em relação ao controle. Diferentemente do nosso trabalho, Broulik et al. (2010) utilizando o princípio de Arquimedes para determinação da densidade óssea, verificou redução da mesma nos animais submetidos ao alcoolismo. Contudo, nossos resultados concordam com Broulik et al. (2010) ao verificar a redução dos parâmetros mecânicos do Tm do fêmur nos animais com dieta alcoólica quando comparados ao controle (Tabela 4). O uso prévio de flúor ao álcool (FA) resultou em valores levemente superiores comparados ao uso exclusivo de álcool (CA), porém sem diferença estatística (Tabelas 1 e 2).

Trabalhos que estudaram os efeitos do consumo crônico de álcool na DMO de ratos por meio do DXA encontraram resultados semelhantes aos deste estudo. Nyquist et al. (2002) ao analisar os efeitos da dieta de 15% de álcool e glicose, no CMO e DMO em tíbias e fêmures de ratos machos verificaram valores inferiores quando comparados ao grupo controle. No estudo que utilizou ratos de ambos os sexos, com 6 semanas de idade e dieta líquida contendo etanol a 36%, foi encontrado menor valor de DMO no grupo de fêmeas tratadas com álcool (NISHIGUCHI et al., 2000). Em um estudo com 30 ratos Sprague–Dawley de ambos os sexos com 30 dias de idade que receberam álcool a 36% durante 45 dias, suas colunas vertebrais foram removidas e dissecadas, a densidade óssea foi medida por meio de TCQ, que mostrou a redução do tamanho das peças e da DMO no grupo tratado com dieta alcoólica (WEZEMAN et al., 2003).

Apesar dos grupos com uso exclusivo de flúor (F e CF) apresentarem valores superiores de CMO em relação ao controle, estes não diferiram estatisticamente do mesmo. Na análise da DMO os grupos C, F e CF foram similares entre si. A média de CMO e DMO do grupo F foi a maior dentre os grupos e do grupo CA foi a menor (Tabela 1 e 2), reforçando a ocorrência de aumento desses parâmetros analisados com o uso do flúor e redução com o uso do álcool (PHIPPS et al., 2000; SOWERS et al., 2005; WEZEMAN et al., 2003). Na análise dos parâmetros biomecânicos os grupos que consumiram fluoreto (F e CF) não apresentaram diferença estatística do grupo Controle (Tabela 4). Os grupos com consumo de álcool (CA e FA) apresentaram os menores valores de Fmax para ruptura dos ossos, sendo estes dados concordantes com Broulik et al. (2010) que observaram a redução de 12 % na

força mecânica para ruptura do fêmur em ratos após consumo de etanol. Foi observado que o consumo de flúor por menor período (grupo CF) apresentou os maiores valores para ruptura dos ossos em todos os tempos, bem como rigidez e resiliência. Porém o consumo de flúor não apresentou diferença significativa nos parâmetros densitométricos e biomecânicos em relação ao grupo controle, diferente de Mello e Gomide (2005) que demonstrou que ratas ovariectomizadas que ingeriram 40 mg de fluoreto de sódio demonstraram melhores características físicas, bioquímicas e biomecânicas do que os das ratas submetidas a ooforectomia sem tratamento e os das não submetidas a ooforectomia, de modo que o flúor melhorou a qualidade óssea.

Alguns autores como Ammann et al. (1998) e Phipps et al. (1998) relacionaram o aumento da formação óssea, ao aumento do número de osteoblastos dado pelo flúor. Outros estudos ainda demonstram que o NaF pode reforçar a indução da replicação de células através dos fatores de crescimento de polipeptídicos incluindo o fator I de crescimento semelhante insulina (IGF-I). Este efeito provavelmente está relacionado com o incremento da fosforilação da proteína tirosina pelo fluoreto em osteoblastos (AMMANN et al., 1998).

Na análise da interação grupo*tempo quanto ao CMO e DMO houve diferença estatística significativa apenas no grupo F, mas sem diferença entre o tempo final e o inicial (Tabela 3), indicando que o fator tempo de consumo utilizado em nosso experimento não interferiu nesses resultados. Na análise biomecânica o grupo FA apresentou redução significativa da rigidez e resiliência ao longo do tempo sendo capaz de absorver menos energia, e com valores significativamente diferentes do grupo Controle aos 28 dias (Tabela 5). O grupo CA apresentou redução significativa da rigidez com o tempo, sendo diferente do controle. Assim, o consumo de álcool parece alterar as propriedades mecânicas do osso ao longo do tempo. Broulik et al. (2010) relacionou estas alterações à perda óssea cortical induzida pelo alcoolismo, embora os mecanismos desse efeito esquelético não estejam elucidados.

Assim, dentro dos limites deste trabalho, o consumo prolongado de álcool reduz os parâmetros densitométricos e biomecânicos ósseos, independente do uso prévio de flúor. Contudo mais estudos devem ser realizados analisando os efeitos na estrutura óssea resultante da interação fluoreto de sódio e álcool.

6 Conclusão

De acordo com a metodologia utilizada neste estudo pode-se concluir que:

- O uso crônico de álcool promoveu perda óssea mineral e maior fragilidade óssea detectada no terço médio pelos testes biomecânicos, mesmo com o uso prévio de NaF.
- O consumo de NaF de maneira prolongada demonstrou uma tendência de aumento na densidade mineral óssea e na resistência óssea no terço médio.

Referências

Alencastro C. Álcool é o combustível da violência. Disponível em: http://www.alcoolismo.com.br/artigos/alcool_e_ocombustivel_da_violencia.html. Acesso em: 11 Ago. 2011.

Almeida LM, Coutinho ESF. Prevalência de consumo de bebidas alcoólicas e de alcoolismo em uma região metropolitana do Brasil. Rev de Saúde Pública. 1993 Feb;27(1):23-9.

Ammann P, Rizzoli R, Caverzasio J, Bonjour JP. Fluoride potentiates the osteogenic effects of IGF- I in aged ovariectomized rats. Bone. 1998;22:39-43.

Buchaim RL, Buchaim DV, Ustulin DR, Roque DD, Andreo JC, Roque JS. Histological evaluation of the alcohol effects in the rats tibia bony repair. Arq Ciênc Saúde. 2004;11(3):142-5.

Broulik P, Vondrova J, Ruzicka P, Sedlacek R. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. Physiological Research. 2010;59:599-604.

Bertin E, Ruiz JC, Mourrot J, Peiniau P, Portha B. Evaluation of dual-energy X-Ray absorptiometry for body-composition assessment in rats. J Nutr. 1998;128:1550-4.

Chiaverini V. Tecnologia mecânica: estrutura e propriedades, processos de fabricação. São Paulo: McGraw-Hill; 1979.

Chen H, Hayakawa D, Emura S, Ozawa Y, Taguchi H, Yano R, Shoumura S. Effects of ethanol on the ultrastructure of the hamster femur. Histol Histopathol. 2001;16:763-70.

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

Elmali N, Ertem K, Ozen S, Inan M, Baysal T, Guner G, Bora A. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002 Apr;26(4):509-13.

Faustino SES, Stipp ACM. Effects of chronic alcoholism and alcoholic detoxication on rat submandibular glands: morphometric study. *J Appl Oral Sci*. 2003 Jan./Mar;11(1):21-6.

Gonzalez-Calvin JL, Garcia-Sanchez A, Bellot V, Munoz-Torres M, Raya-Alvarez E, Salvatierra-Rios D. Mineral metabolism, osteoblastic function and bone mass in chronic alcoholism. *Alcohol Alcohol*. 1993 Sep;28(5):571-9.

Hogan HA, Sampson HW, Cashier E, Ledoux N. Alcohol consumption by young actively growing rats: a study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. *Alcohol Clin. Exp Res*. 1997 Aug;21(5):809-16.

Jiang Y, Zhao J, Van Audekercke R, Dequeker J, Geusens P. Effects of low-dose long-term sodium fluoride preventive treatment on rat bone mass and biomechanical properties. *Calcif Tissue Int*. 1996 Jan;58(1):30-9.

Lauing K, Himes R, Rachwalski M, Strotman P, CallaciBinge JJ. Alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. *Alcohol*. 2008;42(8):649-56.

Larato DC. Oral tissue changes in the chronic alcoholic. *J Periodontol*. 1972; 43(12):772-3

Mello LCP, Gomide LB. Respostas físicas, químicas e biomecânicas do osso de ratas ovariectomizadas submetidas a diversas ingestões de flúor suplementar. *Rev Nutr.* 2005;18(5):593-600.

Nishiguchi S, Shiomi S, Tamori A, Habu D, Takeda T, Tanaka T, Ochi H. Effect of ethanol on bone mineral density of rats evaluated by dual-photon X-ray absorptiometry. *J Bone Miner Metab.* 2000;18(6):317-20.

Nyquist, F.; Duppe, H.; Obrant, K.J.; Bondeson, L.; Nordsletten. L. Effects of alcohol on bone mineral and mechanical properties of bone in male rats. *Alcohol Alcohol.* 2002;37:21-4.

Opinya GN, Imalingat B. Skeletal and dental fluorosis:two cases reports. *East Afr Med J.* 1991 Apr;68(4):304-11.

Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos: Comité de Expertos de la OMS en Farmacodependencia. Ginebra (Suiza): Organización Mundial de la Salud, 1970.

Petersen MM, Nielsen PK, Lewin E, Olgaard K. Dual energy X-ray absorptiometry in small rats with low bone mineral density. *Calcif Tissue Int.* 2000; 67:455-9.

Phipps KR, Orwoll ES, Bevan L. The association between water-borne fluoride and bone mineral density in older adults. *J. Dent Res.* 1998;77:1739-48.

Phipps KR, Orwoll ES, Mason JD, Cauley JA. Community water fluoridation, bone mineral density, and fractures: prospective study of effects in older women. *BMJ* 2000; 321:860-4

Rangé BP; Marlatt GA. Terapia cognitivo-comportamental de transtornos de abuso de álcool e drogas *Rev Bras Psiquiatr.* 2008;30(Suppl II):S88-95.

Souza MC, Assemany FS, Lima ATC, Souza R.F. Glucocorticoids and osteoporosis – a review. R. Cienc Méd Biol. 2010;9(Supl.1):57-64.

Sogaard CH, Mosekilde L, Thomsen JS, Richards A, McOsker JE. A comparison of the effects of two anabolic agents (fluoride and PTH) on ash density and bone strength assessed in an osteopenic rat model. Bone. 1997 May;20(5):439-49.

Sowers, M.; Whiford, G.M.; Clark, M.K.; Jannausch, M.L. Elevated serum fluoride concentrations in women are not related to fractures and bone mineral density. J Nutr. 2005;135:2247-52.

Tirapelli LF, Tirapelli DPC, Schimming BC. Ultrastructural alterations of the Parotid Glands of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. Rev Chil Anat. 2001 Ago;19(2):175-82.

Trevisiol CH, Turner RT, Pfaff JE, Hunter JC, Menagh PJ, Hardin K, Ho E, Iwaniec UT. Impaired osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. Bone. 2007 Aug;41(2):175-80.

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

Vicentini CR. Densitometry analysis, histomorfometry and biomechanical in femurs of rats submitted to the weightlessness and treadmill physical activity [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária; 2006.

Wezeman FH, Jukneli D, Frost N, Callaci JJ. Spine bone mineral density and vertebral body height are altered by alcohol consumption in growing male and female rats. Alcohol. 2003;31:87-92.

Ziegler R. Fluoride therapy of osteoporosis. Ther Umsch. 1991 Feb;48(2):84-90.

ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética da Experimentação Animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba



COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEAA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto **"BIOMECÂNICA E DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DE FÊMURES DE RATOS SUBMETIDOS AO ALCOOLISMO CRÔNICO E CONSUMO DE FLÚOR"** sob responsabilidade da **Profa. Dra. Leda Maria Pescianini Salzedas e Ana Maria Pires Soubhia** e colaboração de **Bruna Gabriela dos Santos Kotake, Ariane Moureira Fernandez** está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) foi aprovado pela CEEA em 21/06/2010 de acordo com os protocolos 2010-002882.

Araçatuba, 21 de Junho de 2010

Prof.^a Adj. Tereza Cristina Cardoso da Silva
Presidente da CEEA- FOA/UNESP

Anexo B: Complementação do texto.

Tabela 1: Valores da média na Análise Biomecânica da Cabeça.

Grupos	Força Máxima (N)			Rigidez (10^3N/m)			Resiliência (10^{-3}J)		
	3 dias	10 dias	28 dias	3 dias	10 dias	28 dias	3 dias	10 dias	28 dias
C	140,78	162,70	135,78	173,37	171,66	193,06	89,921	107,28	93,746
F	168,03	149,05	146,59	204,61	182,42	212,78	108,77	81,749	72,867
CA	147,84	130,90	160,39	178,98	152,35	141,12	75,877	92,185	102,33
FA	153,74	162,31	146,48	148,92	206,33	209,83	115,45	95,372	74,356
CF	177,20	149,07	164,42	195,94	183,70	211,74	116,17	94,023	122,08

Tabela 2: Valores da Média na Análise Biomecânica dentro de cada Grupo na Cabeça.

Grupos	Força Máxima (N)	Rigidez (10^3N/m)	Resiliência (10^{-3}J)
C	146,46	179,37	96,98
F	154,56	199,94	87,80
CA	146,38	157,49	90,13
FA	154,18	188,36	95,06
CF	163,56	197,13	110,76

Tabela 3. Valores da média do CMO e DMO obtidas do terço médio nos fêmures direitos de ratos de acordo com os grupos nos tempos de análise.

Grupos	CMO [#]	DMO ^{\$}
C	0,0101	0,1982
F	0,0106	0,2105
CA	0,0090	0,1766
FA	0,0086	0,1738
CF	0,0103	0,2050

Tabela 4: Valores da média do CMO e DMO no terço médio.

Grupos	CMO			DMO		
	3 dias	10 dias	28 dias	3 dias	10 dias	28 dias
C	0,01	0,01	0,01	0,19	0,20	0,20
F	0,01	0,01	0,01	0,20	0,19	0,22
CA	0,01	0,01	0,01	0,18	0,16	0,19
FA	0,01	0,01	0,01	0,18	0,17	0,17
CF	0,01	0,01	0,01	0,20	0,19	0,22

Tabela 5. Valores da média do CMO e DMO obtidas na Cabeça dos fêmures direitos de ratos de acordo com os grupos nos tempos de análise.

Grupos	CMO[#]	DMO^{\$}
C	0,0017	0,2535
F	0,0018	0,2728
CA	0,0016	0,2510
FA	0,0017	0,2517
CF	0,0019	0,2713

Tabela 6: Valores da média do CMO e DMO na Cabeça.

Grupos	CMO			DMO		
	3 dias	10 dias	28 dias	3 dias	10 dias	28 dias
C	0,0019	0,0016	0,0017	0,27	0,24	0,25
F	0,0017	0,0019	0,0020	0,25	0,27	0,30
CA	0,0017	0,0014	0,0017	0,27	0,22	0,26
FA	0,0019	0,0016	0,0017	0,26	0,24	0,25
CF	0,0020	0,0019	0,0020	0,28	0,25	0,28