

# Efeitos de 03 dietas alcoólicas na reparação óssea em tibia de ratos

## *Effects of three alcoholic diets on the bone repair in the tibia of rats*

### **Rogério Leone BUCHAIM**

Professor Assistente Doutor – Departamento de Ciências Básicas – Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista – UNESP – Araçatuba – SP – Brasil

### **Daniela Vieira BUCHAIM**

Mestre em Biologia Oral – Universidade do Sagrado Coração – USC – Bauru – SP – Brasil

### **Jesus Carlos ANDREO**

Professor Associado – Departamento de Ciências Biológicas – Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo – USP – Bauru – SP – Brasil

### **Domingos Donizeti ROQUE**

### **José Sidney ROQUE**

Doutorandos – Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu – SP – Brasil

### **Antônio de Castro RODRIGUES**

Professor Associado – Departamento de Ciências Biológicas – Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo – USP – Bauru – SP – Brasil

---

#### **RESUMO**

Os efeitos do uso abusivo e prolongado do álcool sobre vários tecidos, incluindo o ósseo, têm sido amplamente estudados. A quantidade de defeitos ósseos criados cirurgicamente e pelos vários tipos de acidentes tem aumentado e existe uma preocupação muito grande quanto ao reparo desses defeitos, associados ao alcoolismo. O objetivo desta pesquisa foi de observar histologicamente os efeitos de 03 dietas alcoólicas na reparação óssea e se o aumento da concentração do álcool também interfere neste fenômeno. Foram utilizados 64 ratos machos (*Rattus norvegicus*), divididos em 4 grupos de 16 animais cada, assim distribuídos: Grupo controle (C) – animais que não receberam álcool; Grupos Experimentais I, II e III (EI, EII e EIII, respectivamente) - animais que foram submetidos à alcoolização de 6%, 15% e 25% respectivamente, por um período de 90 dias. Após este período a tibia esquerda de todos os animais foi submetida a uma cirurgia onde se realizou uma cavidade no sentido longitudinal. Quatro animais de cada grupo foram sacrificados em períodos de 10, 20, 40 e 60 dias contados a partir do dia da cirurgia experimental. As tibias foram retiradas, processadas histologicamente e submetidas às colorações de HE e tricrômico de Masson. Os resultados mostraram que a neoformação óssea foi decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica e pode-se concluir que as 03 dietas alcoólicas (6%, 15% e 25%) influenciam a neoformação óssea em todas as suas fases, retardando o processo de reparação óssea.

#### **UNITERMOS**

Rato; tibia; álcool; osteogênese.

---

#### **INTRODUÇÃO**

Numerosos estudos relatam que o consumo crônico de álcool interfere no metabolismo ósseo. O efeito da intoxicação aguda causada pelo álcool tem sido muito documentado, tanto em humanos quanto em animais experimentais. Estudos em animais, sobre o uso abusivo do álcool, sugerem que o etanol inibe o crescimento ósseo e interfere no processo de reparação de fraturas<sup>7,10</sup>.

Segundo Dai et al.<sup>5</sup> (2000), o desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, provocada pelo álcool, atua de forma negativa na reparação óssea. Esse desequilíbrio pode ser agravado se o alcoolismo estiver associado ao fumo.

Em 2001, Turner et al.<sup>17</sup> notaram que em ratos adultos, com consumo moderado do etanol (3% de ingestão calórica), ocorreu uma diminuição no processo

de turnover ósseo, suportando a sugestão que mesmo a presença do álcool em nível moderado tem um efeito adverso sobre o osso medular.

A osteoporose está associada consideravelmente com morbidade e mortalidade em mulheres pós-menopausa, nas quais o consumo moderado do álcool apresenta efeitos negativos sobre a densidade mineral óssea, aumentando a incidência de fraturas<sup>2,18</sup>.

O uso abusivo do álcool inibe o crescimento ósseo, diminui sua formação e aumenta o risco de fraturas, interferindo no processo de cicatrização<sup>3,7,15</sup>.

Kim et al.<sup>8</sup> (2003), realizaram uma pesquisa em mulheres alcoólatras que não apresentavam cirrose hepática para avaliar os efeitos do consumo crônico do álcool sobre a densidade mineral óssea. Eles concluíram que houve uma redução da densidade óssea, principalmente no fêmur e osso do quadril, associado à osteoporose. Além disso, verificaram também que a osteocalcina, um marcador da formação óssea apresentou-se pouco diminuída.

Recentemente, um estudo foi realizado para observar os efeitos do álcool sobre o gene de expressão, síntese protéica e mineralização, em células-tronco mesenquimais derivadas da medula, induzidas pela diferenciação osteogênica “in vitro”. Coletivamente os dados sugeriram que o álcool altera a diferenciação osteogênica sobre as culturas de células ósseas humanas mesenquimais derivadas da medula durante sua formação, reduzindo consequentemente a neoformação óssea<sup>21</sup>.

Baseado no citado anteriormente propôs-se realizar esta pesquisa com o objetivo de observar histologicamente os efeitos de 03 dietas alcoólicas (6%, 15% e 25%) no processo de reparação óssea.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 64 ratos machos (*Rattus norvegicus*), adultos (com aproximadamente 03 meses de idade), da linhagem Wistar, com peso médio aproximado de 293 gramas.

Os animais foram distribuídos em 4 grupos, de 16 ratos cada, sendo:

- 1) *Grupo Controle (C)*, que recebeu água de torneira como dieta líquida.
- 2) *Grupo Experimental I (E I)*, que recebeu álcool etílico a 6%, diluído com água de torneira.
- 3) *Grupo Experimental II (E II)*, que recebeu álcool etílico a 15%, diluído com água de torneira.
- 4) *Grupo Experimental III (E III)*, que recebeu álcool etílico a 25%, diluído com água de torneira.

Semanalmente realizou-se a mensuração dos pesos dos animais.

Os grupos experimentais foram submetidos, inicialmente, a adaptação gradativa ao álcool, até alcançarem o nível máximo: Grupo EI 6%, Grupo EII 15% e Grupo EIII 25%. Após esse período de adaptação, os animais dos grupos experimentais continuaram a receber dietas alcoólicas, na concentração final, por um período de 90 dias.

O álcool utilizado para diluição foi o etílico absoluto (LABSYNTH CH<sub>3</sub> CH<sub>2</sub> OH; PM 46.07).

Após o período de alcoolização de 90 dias os animais foram submetidos à cirurgia experimental e continuaram sendo alcoolizados após a realização da cirurgia até o período corresponde ao do sacrifício para cada grupo.

Para a cirurgia, os ratos foram submetidos à anestesia geral pela injeção intramuscular de Cloridrato de tiletamina (125,0 mg) associado a Cloridrato de zolazepam (125,0 mg) na posologia de 50,0 mg/kg IM (Zoletil 50, Virbac).

Realizou-se a tricotomia na região ventral do membro pélvico esquerdo e em seguida, com uma lâmina de bisturi nº 15, uma incisão linear de 20 mm. de extensão no sentido crânio-caudal. Com uma broca esférica de aço nº 6, montada em micromotor de baixa rotação, preparou-se uma cavidade de aproximadamente 3 mm. de diâmetro e, em profundidade, atingindo a medula óssea. Esse procedimento foi realizado com abundante irrigação de solução de Cloreto de Sódio a 0,9%. Posteriormente os tecidos foram reposicionados e as suturas realizadas.

Por injeção excessiva do anestésico citado anteriormente, 04 ratos de cada grupo foram sacrificados em períodos de 10, 20, 40 e 60 dias contados a partir do dia da cirurgia.

As peças ósseas retiradas das tíbias foram fixadas em formol tamponado a 10% durante 24 horas, lavadas em água corrente por 12 horas e, descalcificadas em solução de citrato de sódio e ácido fórmico, em partes iguais, durante 45 dias. Em seguida, as peças passaram pelo processo laboratorial de rotina para inclusão em parafina.

Obtidos os blocos, foram realizados cortes longitudinais com espessura de 06 micrômetros em um micrótomo rotativo, resultando em cortes semi-seriados que foram submetidos à coloração pela hematoxilina e eosina e pelo tricrômico de Masson, para estudo histomorfológico sob microscopia de luz e fotografados em um fotomicroscópio.

Com relação ao peso dos animais, utilizaram-se parâmetros comparativos entre os grupos controle e experimentais, em 11 momentos pré-determinados, assim

denominados: S1 (início do experimento), S2 (primeira semana de dieta alcoólica adaptativa), S3 (segunda semana de dieta alcoólica adaptativa), S4 (terceira semana de dieta alcoólica adaptativa), S5 (30 dias de dieta alcoólica definitiva), S6 (60 dias de dieta alcoólica definitiva), S7 (90 dias de dieta alcoólica definitiva e dia da cirurgia experimental), S8 (10 dias pós-operatório e 1º sacrifício), S9 (20 dias pós-operatório e 2º sacrifício), S10 (40 dias pós-operatório e 3º sacrifício), S11 (60 dias pós-operatório e 4º sacrifício)

O sangue foi coletado no dia do sacrifício, através de punção intracárdica e analisado por cromatografia em camada gasosa e detecção por ionização por chama<sup>4,13</sup> no Centro de Toxicologia da UNESP - Campus de Botucatu - SP, e avaliado estatisticamente pela análise de variância com um fator ANOVA, para verificação da dosagem de etanol.

## RESULTADOS

### Observação histológica dos efeitos de 03 dietas alcoólicas na reparação óssea

#### *Animais sacrificados 10 dias após a cirurgia experimental*

Na Figura 1 nota-se que:

- a loja cirúrgica está parcialmente ocupada por trabéculas ósseas (TO) delgadas. No espaço intertrabecular evidencia-se tecido conjuntivo rico em fibroblastos (TC) e sem diferenciação óssea;
- a ossificação é mais intensa no Grupo C (Fig. 1A) em relação aos demais grupos, sendo que o Grupo EIII (Fig. 1D) apresenta nas regiões superficiais maior quantidade de tecido conjuntivo (TC).
- a neoformação óssea é decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica.

#### *Animais sacrificados 20 dias após a cirurgia experimental.*

Na Figura 2 nota-se que:

- a loja cirúrgica, em sua porção superficial, encontra-se ocupada por trabéculas ósseas (TO) neoformadas que deixam consideráveis espaços com tecido conjuntivo (TC) sem diferenciação óssea (Figs. 2A e 2B);
- outras vezes, o tecido ósseo neoformado (TO) ocupa a porção profunda da loja (Fig. 2C e 2D);

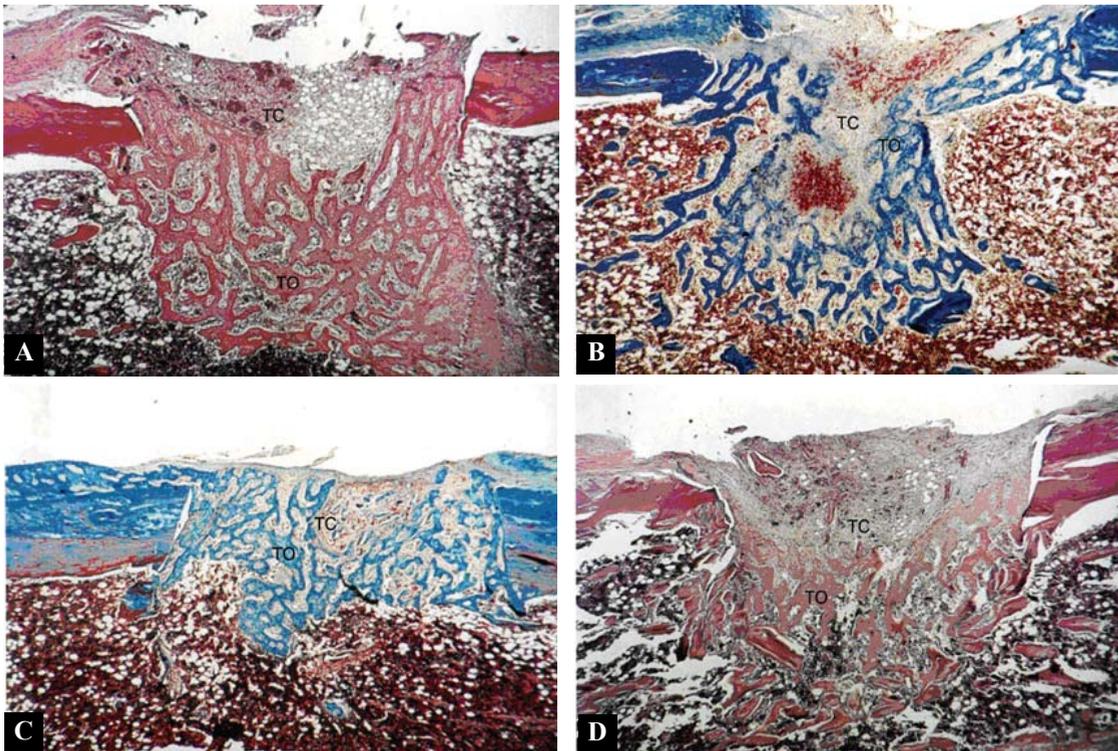


Figura 1 – 10 dias - Cavidade cirúrgica. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (A + D) e Tricrômico de Masson (B + C).

- no grupo EIII (Fig. 2D) as trabéculas ósseas (TO) são mais delgadas e com tecido conjuntivo (TC) sem diferenciação óssea localizado superficial-

- mente na loja cirúrgica, e em maior quantidade quando comparado com os demais grupos;  
• a neoformação óssea é decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica.

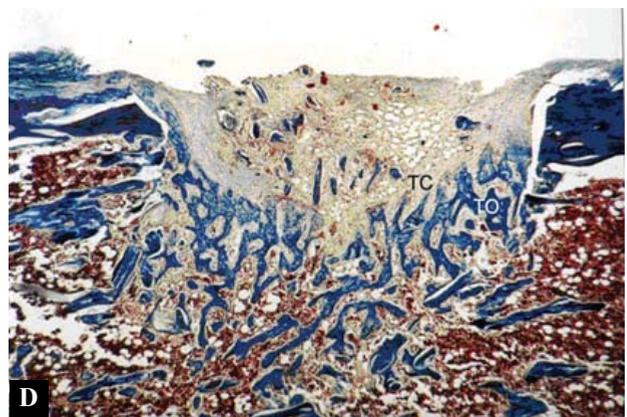
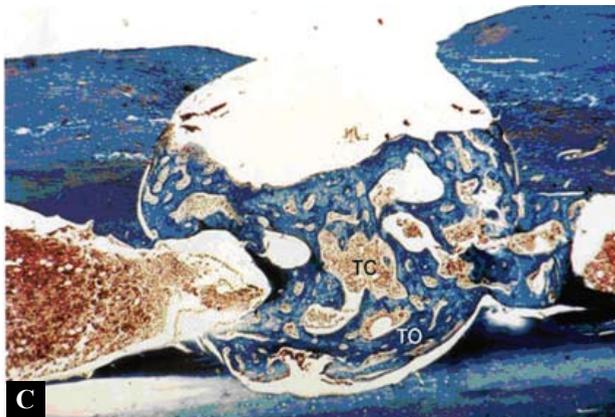
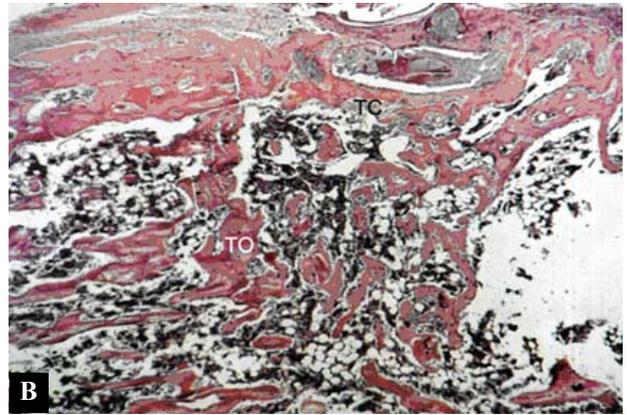
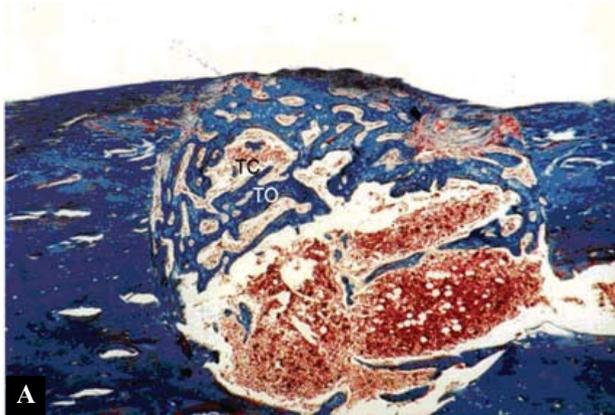


Figura 2 -20 dias - Cavidade cirúrgica. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (B) e Tricrômico de Masson (A + C + D).

### **Animais sacrificados 40 dias após a cirurgia experimental**

Na Figura 3 nota-se que:

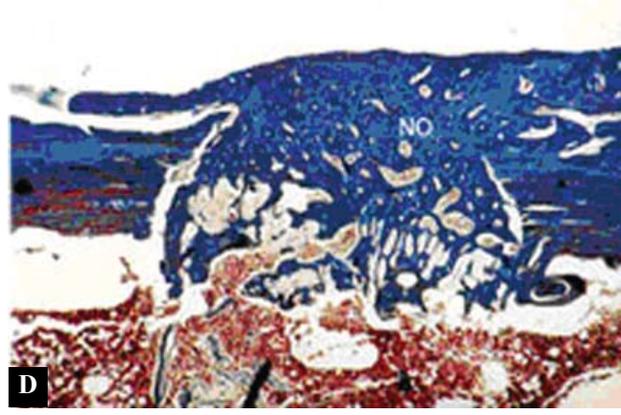
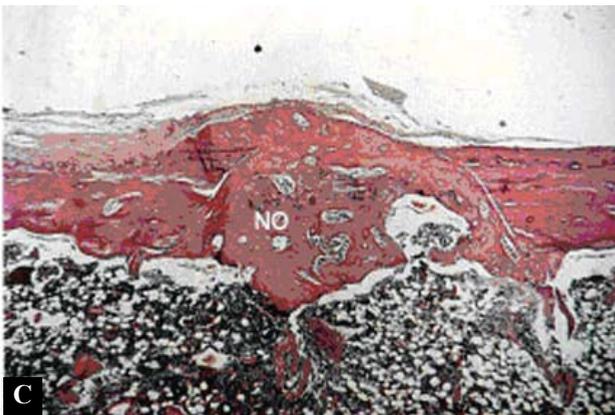
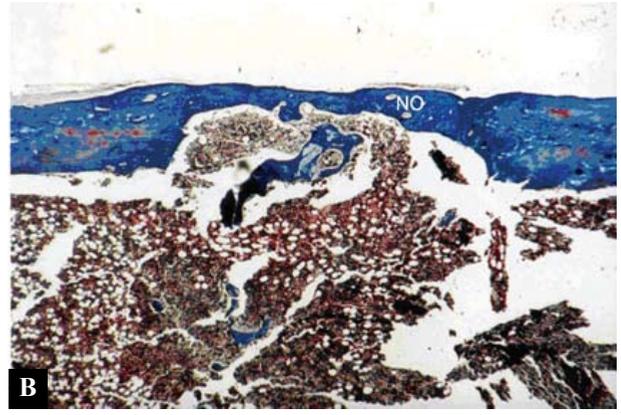
- a loja cirúrgica encontra-se reparada por tecido ósseo bem diferenciado em todos os grupos;
- em alguns casos, a espessura da neocortical óssea (NO) é mais delgada que a pré-existente (figs.3A e 3B);
- no Grupo EIII (Fig. 3D), nota-se a neocortical (NO) com formação óssea além das superfícies externa e interna da parede óssea, mas ainda desorganizada na região de transição cortical-medular, comparando-se com os grupos anteriores;

- nesse período os efeitos da dieta alcoólica são menos evidentes, quando comparado ao anterior.

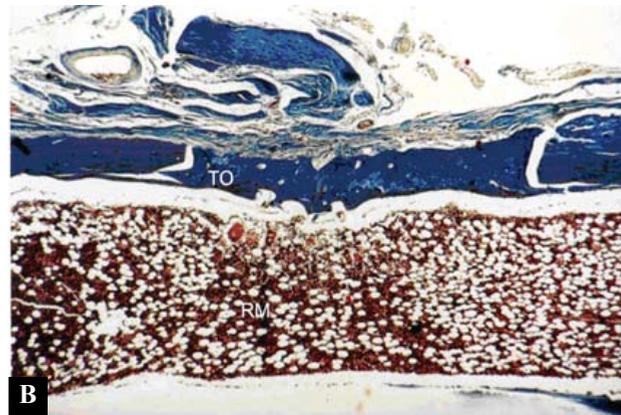
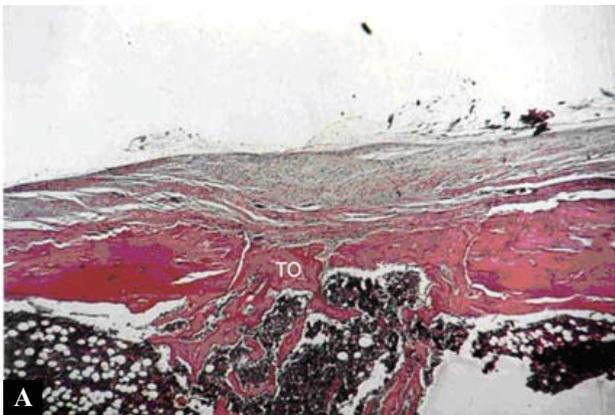
### **Animais sacrificados 60 dias após a cirurgia experimental.**

Na Figura 4 observa-se que:

- a loja cirúrgica encontra-se reparada por tecido ósseo (TO) bem desenvolvido, como no período anterior. O Grupo EIII (Fig. 4B) apresenta região medular (RM) organizada, compatível com os demais grupos.
- os Grupos C e EI já apresentaram reparação óssea completa desde o período anterior.
- nesse período os efeitos da dieta alcoólica não são evidentes, quando comparado ao anterior.



Figuras 3A-D – 40 dias - Cavidade cirúrgica. Grupo C (A), Grupo EI (B), Grupo EII (C), Grupo EIII (D). Aumento 25 X. HE (A + C) e Tricrômico de Masson (B + D).



Figuras 4AB – 60 dias - Cavidade cirúrgica. Grupo EII (A), Grupo EIII (B). Aumento 25 X. HE (A) e Tricrômico de Masson (B).

### Peso dos animais

Os dados da Tabela 1 demonstram que os animais, comparando-se o momento 1 (início do experimento) e o momento 11 (60 dias pós-operatório e 4º sacrifício), apresentaram ganho de peso, que percentualmente

variam entre os grupos, sendo que no Grupo C o ganho foi de 61,4%, no Grupo EI foi de 42,37%, no Grupo EII foi de 31,81% e no Grupo EIII foi de 26,48%. Portanto, o ganho de peso foi menor de acordo com o aumento da dosagem alcoólica entre os grupos.

**Tabela 1 – Valores médios do peso dos animais segundo os 11 momentos pré-determinados.**

Grupos	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11
C	285,7	312,6	318,6	343,8	379,0	385,4	399,8	399,6	419,8	437,7	461,3
E I	293,3	312,6	318,0	338,1	370,8	381,6	396,7	394,5	420,9	421,2	417,6
E II	299,9	310,8	308,8	317,3	340,2	347,9	355,5	360,9	381,6	374,7	395,3
E III	293,0	304,6	299,9	300,0	312,7	328,3	345,6	349,6	371,5	366,7	370,6

## Dosagem de etanol no sangue

Os valores médios da concentração alcoólica, encontrados no sangue dos animais, estão na Tabela 2.

As letras diferentes (a,b,c) indicam diferenças significantes estatisticamente.

Os dados da Tabela 2 demonstram que houve um aumento da concentração de etanol no sangue dos animais do grupo EI para o EIII, inclusive com uma diferença significativa estatisticamente.

**Tabela 2 – Valores médios da concentração alcoólica.**

	E1	E2	E3
Média	0,313 <sup>a</sup>	0,429 <sup>b</sup>	0,540 <sup>c</sup>
Desvio Padrão	± 0,04	± 0,03	± 0,05

## DISCUSSÃO

A dieta alcoólica utilizada no presente trabalho (6%, 15% e 25%) está de acordo com trabalhos anteriores, onde os grupos experimentais foram submetidos a uma adaptação gradativa, tornando esses animais alcoólatras crônicos<sup>16,19</sup>.

Os resultados encontrados mostraram que o álcool provocou uma diminuição no peso dos animais, ou seja, o ganho de peso foi inversamente proporcional à dosagem alcoólica dos grupos, e esses dados concordam com outras pesquisas, onde o álcool interferiu também no crescimento dos animais<sup>3,14</sup>.

O fator subnutrição com deficiência vitamínica, mineral e de nutrientes essenciais é constante em indivíduos alcoólatras<sup>11</sup>. Neste trabalho não foi feita uma análise para verificar se ocorreu a subnutrição com deficiência vitamínica, porém, a perda de peso citado no parágrafo anterior, poderia indicar uma subnutrição desses animais. Entretanto, foi detectada a presença do álcool no sangue de todos os animais dos grupos

experimentais através da cromatografia em camada gasosa e detecção por ionização por chama<sup>4,13</sup>.

Embora o alcoolismo tenha sido um dos maiores problemas médicos e sociais no século passado, a apreciação de que o abuso do álcool possa levar as doenças ósseas é mais recente. No tecido ósseo, comparativamente com os outros tecidos, a concentração de álcool é baixa, mas as alterações ocorrem de acordo com o tempo de uso da droga<sup>20</sup>.

Os resultados obtidos nesse experimento concordam com estudos dos efeitos da dieta alcoólica sobre a proliferação de células osteoblásticas e retardo no processo de reparação alveolar<sup>9</sup>, pois nos animais sacrificados 20 dias após a cirurgia experimental, a neoformação óssea foi decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica, levando à produção de trabéculas ósseas mais delgadas e tecido conjuntivo em maior quantidade quando comparado com os demais grupos. Estes aspectos indicam que o álcool possui vários efeitos na inibição da remodelação óssea.

O alcoolismo crônico aumenta também a suscetibilidade e a severidade das infecções, através da diminuição dos mecanismos de defesa imunológica, associada ao decréscimo de células dendríticas no baço<sup>1,6</sup>.

O desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, provocado pelo álcool, atuando de forma negativa no processo de reparação óssea, pode ser agravado se o alcoolismo estiver associado ao fumo<sup>5</sup>, levando a perda de densidade mineral óssea<sup>12</sup>, aumento do risco de fraturas<sup>15</sup> e incidência de osteoporose<sup>10</sup>.

## CONCLUSÃO

De acordo com o objetivo estabelecido no presente trabalho, é possível concluir que as 03 dietas alcoólicas (6%, 15% e 25%) influenciam a neoformação óssea em todas as suas fases, retardando o processo de reparação óssea, e que a neoformação óssea foi decrescente de acordo com o aumento da concentração alcoólica.

**ABSTRACT**

The effects of long-term alcohol abuse on several tissues, including bone, have been extensively studied. Considering the increase in occurrence of bone defects caused by trauma or even created for surgical purposes, the putative influence of alcoholism on bone healing has been a matter of growing concern. The aim of the present study was to assess histologically the effects of three schemes of alcohol intake at different concentrations on bone repair. 64 male rats (*Rattus norvegicus*) were assigned to four experimental groups (n=16), which received alcohol diluted with drinking water to the final concentrations of 6% (Group EI), 15% (Group EII) or 25% (Group EIII). The control group (Group C) received drinking water. After 90 days, the animals were subjected to a surgical procedure in which a cavity (3 mm in width) was created on the left tibia. Four animals of each group were sacrificed on 10<sup>th</sup>, 20<sup>th</sup>, 40<sup>th</sup> or 60<sup>th</sup> days after the surgical procedure. The samples were processed for histological analysis, paraffin embedded and stained with hematoxylin and eosin; and Masson trichomic. The qualitative histological analysis showed that the amount of bone neoformation was inversely proportional to the alcohol concentration. It may be concluded that the schemes of alcohol consumption at the concentrations used in the present study (6%, 15% e 25%) led to a decrease in osseous neoformation in all analyzed periods, resulting in delay on the healing process.

**UNITERMS**

Rats; tibia; alcohol; osteogenesis.

**REFERÊNCIAS**

- Aloman C, Gehring S, Wintermeyer P, Kusushita N, Wands JR. Chronic ethanol consumption impairs cellular immune responses against HCV NS5 protein due to dendritic cell dysfunction. *Gastroenterology* 2007 Feb;132(2):698-708
- Berg KM, Kunins HV, Jackson JL, Nahvi S, Chaudhry A, Harris KA Jr, et al. Association between alcohol consumption and both osteoporotic fracture and bone density. *Am J Med.* 2008 May;121(5):406-18.
- Buchaim RL, Roque DD, Roque JS, Toledo Filho JL, Andreo JC, Okamoto T. Gen-Phos implant in surgical cavities performed in the tibia of rats submitted to experimental chronic alcoholism. A microscopic study. *Rev FOB.* 2002;10(1):17-22.
- Ciola R. Introdução à cromatografia em fase gasosa. São Paulo: EDUSP; 1973.
- Dai J, Lin D, Zhang J, Habib P, Smith P, Murtha J. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J Clin Invest.* 2000;106(7):887-95.
- Edsen-Moore MR, Fan J, Ness KJ, Marietta JR, Cook RT, Schlueter AJ. Effects of chronic ethanol feeding on murine dendritic cell numbers, turnover rate, and dendropoiesis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008 Jul;32(7):1309-20.
- Elmali N, Ertem K, Ozen S, Inan M, Baysal T, Guner G. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002;26:500-13.
- Kim MJ, Shim MS, Kim MK, Lee Y, Shin YG, Chung CH, et al. Effect of chronic alcohol ingestion on bone mineral density in without liver cirrosis. *Korean. J. Intern. Med.* 2003 Sep.;18(3):174-80.
- Klein RF, Fausti KA, Carlos AS. Ethanol inhibits human osteoblastic cell proliferation. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996;20(3):572-8.
- Lewiecki EM. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2008 Jun;35(2):301-15,ix.
- Moreno Otero R, Cortés JR. Nutrition and chronic alcohol abuse. *Nutr Hosp.* 2008 May;23 Suppl 2:3-7.
- Nisiguchi S, Shiomi S, Tamori A, Habu D, Takeda T, Tanaka T, et al. Effect of ethanol on bone mineral density of rats evaluated by dual-photon x – ray absorptiometry. *J. Bone Miner Metab.* 2000;18(6):317-320.
- Reed D, Cravey RH. A quantidade gas chromatographic method for alcohol determination. *Forensic Sci. Soc. J.* 1971;11:263-65.
- Sampson HW. Effect of alcohol consumption on adult an aged bone: a histomorphometric study of the rat animal model. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998 Dec.;22 (9):2029-34.
- Sartori C, Ceccanti M, Diacenti D, Attilia ML, Ioppo L, D'Erasmus E, et al. Skeletal turnover, bone mineral density, and fractures in male chronic abusers of alcohol. *Endocrinol Invest.* 2008 Apr;31(4):321-6.
- Tirapelli LF, Tamega OJ, Petroni S. Ultrastructural alterations of choroid plexuses of lateral ventricles of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria.* 2000;58(1):25-31.
- Turner RT, Kidder LS, Kennedy A, Evans GL, Sibonga JD. Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. *J Bone Miner Res.* 2001 Mar.;16(3):589-94.
- Williams FM, Cherkas LF, Spector TD, Macgregor AJ. The effect of moderate alcohol consumption on bone mineral density: a study of female twins. *Ann Rheum Dis.* 2001 Jul.
- Willis BR, Anderson RA Jr, Oswald C, Zanerild LD. Ethanol-induced male reproductive tract pathology as a function of ethanol dose and duration of exposure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983;225(2):470-8.
- Yttri EA, Burk JA, Hunt PS. Intermittent ethanol exposure in adolescent rats: dose-dependent impairments in trace conditioning. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004 Oct;28(10):1433-6.
- Zhaodi G, Wezeman FH. Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Research Society on Alcoholism.* 2004 Mar.;23(3):468-79.

Recebido em 04/08/08

Aprovado em 19/03/09

Correspondência:

Rogério Leone Buchaim

UNESP- Faculdade de Odontologia de Araçatuba,

R. José Bonifácio 1193, 16015-050,

Araçatuba- SP, Brasil.

e-mail: rogerio@foa.unesp.br