

Influência do consumo crônico de álcool etílico na morfologia de ossos longos em ratas adultas jovens

Influence of the chronic consumption of ethyl alcohol in the morphology of long bone in young adult female rats

Daniela Martins de SOUZA

Doutoranda em Biopatologia Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

Daniele ROCHA

Graduanda – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

Karla Zanini KANTORSKI

Doutoranda em Biopatologia Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

Rosilene Fernandes da ROCHA

Professora Doutora – Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – Universidade Estadual Paulista – UNESP – São José dos Campos – SP – Brasil

RESUMO

A ingestão crônica de álcool pode provocar alterações estruturais em vários tecidos, inclusive no tecido ósseo. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da ingestão de álcool etílico sobre a morfometria de fêmures e tíbias em ratas. Foram utilizados quarenta animais (4 meses de idade) divididos em cinco grupos (n=8) conforme a dieta líquida administrada: água (Gc-controle), solução alcoólica a 10% (GA1), solução de sacarose a 13,5% (GI1), solução alcoólica a 20% (GA2), solução de sacarose a 27% (GI2). Os grupos GI1 e GI2 receberam dietas controladas com mesmo valor calórico dos grupos GA1 e GA2, respectivamente. Após oito semanas, os animais foram sacrificados e os fêmures e tíbias removidos. O peso úmido dos espécimes foi avaliado em balança analítica. O comprimento e diâmetros (ântero-posterior e médio-lateral) foram medidos com paquímetro digital. Após, foram realizadas radiografias na metade distal dos espécimes para determinar a localização do tecido ósseo trabecular. Nesta região, secções transversais (1 mm) foram obtidas, em local padronizado, a fim de avaliar o percentual médio da área óssea cortical e medular. A análise estatística (ANOVA) não revelou diferenças significativas ($P>0,05$) para comprimento, diâmetro médio-lateral, diâmetro ântero-posterior e valores percentuais de área óssea cortical e área óssea medular. Pode-se concluir que o consumo de álcool etílico a 10% (que correspondeu a 24,36% das calorias diárias da dieta) e 20% (que correspondeu a 40,10% das calorias diárias da dieta) durante oito semanas em ratas adultas jovens não promoveu alterações morfológicas nos ossos longos.

UNITERMOS

Etanol; efeitos adversos; toxicidade; tecido ósseo; fêmur; efeito de drogas.

INTRODUÇÃO

Osteopenia e osteoporose são doenças sistêmicas que conduzem a alterações no tecido ósseo caracterizadas por baixa massa óssea e degradação da micro-arquitetura, com conseqüente aumento da fragilidade e suscetibilidade à fratura¹⁷. A osteoporose pode ser classificada em primária e secundária. A osteoporose

primária inclui a pós-menopausa, a senil e a idiopática juvenil, sendo mais freqüente em mulheres. As formas secundárias da osteoporose são manifestações conseqüentes de algum processo patológico claramente identificado¹¹, e ao contrário da primária, são mais freqüentemente encontradas em homens¹².

Em mulheres na menopausa, uma a cada quatro é atingida pela osteoporose, e nas mulheres após os 65

anos de idade uma em cada três⁹. Nos homens, recente análise de estudos prévios indica que 58% apresentam osteoporose devido a causas secundárias, das quais as mais frequentes são o consumo excessivo de álcool, a terapia com corticóides e o hipogonadismo¹².

O álcool pode alterar o processo de remodelação óssea direta e indiretamente. A ação direta é verificada através do efeito antiproliferativo sobre os osteoblastos^{1,2,6} e a indireta pela modulação de hormônios reguladores do metabolismo (metabólitos da vitamina D, hormônios das paratireóides e calcitonina)¹⁶, presença de doenças hepáticas⁷ e deficiências nutricionais¹⁰.

Diferentemente dos homens que consomem cronicamente bebidas alcoólicas e apresentam, por consequência, alterações no tecido ósseo, as mulheres que consomem álcool em doses moderadas parecem apresentar maior massa óssea quando comparadas com mulheres que não consomem bebidas alcoólicas¹⁵. O aparente efeito benéfico do álcool nas mulheres é mais evidente no período pós-menopausa do que na idade reprodutiva, indicando haver uma interação entre o efeito do etanol e do estrógeno¹⁴.

Contudo, em adultos jovens de ambos os gêneros que abusam do consumo do álcool há evidências da

ocorrência de desequilíbrio no remodelamento ósseo, com predomínio da reabsorção óssea¹⁵.

Assim, o efeito do álcool sobre o tecido ósseo parece ser influenciado pela etapa de desenvolvimento do indivíduo, tempo de consumo, nível de consumo e gênero^{4,5,14}.

Neste contexto, o presente estudo avaliou o efeito do consumo de álcool etílico sobre o tecido ósseo em ratas fêmeas adultas jovens por meio de avaliações morfométricas nas tíbias e fêmures.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas quarenta ratas fêmeas (*Rattus norvegicus*, variação albinus, Wistar) com aproximadamente cento e vinte dias de idade, pesando em média 250 g. O presente trabalho foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista – Campus de São José dos Campos (Processo número: 011/2004-PA/CEP).

Os animais foram divididos em cinco grupos de oito animais conforme o tipo de dieta administrada (Tabela 1):

Tabela 1 – Grupos experimentais do estudo

Grupos	Dieta líquida	Dieta sólida
Gc - controle	Água	ração
GA1 – álcool 10%	Solução de álcool etílico 10%	ração
GI1 – isocalórico 10%	Solução de sacarose 13,5%	ração
GA2 – álcool 20%	Solução de álcool etílico 20%	ração
GI2 – isocalórico 20%	Solução de sacarose 27%	ração

Todos os animais receberam dieta sólida constituída pela ração Nutrilabor (Guabi, Campinas, SP, Brasil). As soluções de álcool e sacarose foram preparadas com álcool etílico absoluto (Ecibra® - CETUS, Santo Amaro, SP, Brasil) e sacarose (C₁₂H₂₂O₁₁) P.A. (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Inicialmente, os animais dos grupos GA1 e GA2 passaram por um período de adaptação ao álcool. Para o GA1 foi administrada solução alcoólica a 5% por sete dias. Para o GA2 foram doze dias de adaptação, divididos em quatro dias para cada solução (5%, 10%

e 15%). Posteriormente, as soluções alcoólicas nas concentrações experimentais 10% para GA1 e 20% para GA2 foram administradas livremente por oito semanas. Para cada grupo que recebeu álcool foi estabelecido um grupo controle nutricional isocalórico, o qual recebeu dieta controlada, com as mesmas calorias consumidas pelo grupo álcool correspondente tanto em relação à dieta líquida quanto à sólida.

Para isso, diariamente foi verificada a quantidade média de ração (em gramas) e de solução alcoólica (em mililitros) consumida por GA1 e GA2. Desta

forma, as mesmas quantidades foram fornecidas aos grupos isocalóricos correspondentes. Para substituir as soluções alcoólicas a 10% de GA1 e 20% de GA2, foi administrada para G11 solução de sacarose a 13,5% e para G12 solução de sacarose a 27% que apresentam as mesmas calorias das soluções alcoólicas a 10% e 20%, respectivamente.

O grupo controle recebeu ração e água livremente.

Transcorridas oito semanas, todos os animais foram anestesiados com mistura de 13mg/kg de cloridrato de xilasina 2% (Rompun, Bayer, São Paulo, SP, Brasil) e com 33mg/kg de cetamina base (Francotar, Virbac, Roseira, SP, Brasil) via intramuscular. Após o sacrifício, as tíbias e os fêmures foram removidos, dissecados e pesados em balança analítica (Micronal B600). Os espécimes foram fixados em formol a 10%.

Em seguida, mensurações em relação ao comprimento e diâmetro externamente aos ossos foram realizadas com auxílio de paquímetro digital (Starret 727, Itu, SP, Brasil). O comprimento foi obtido de uma extremidade a outra do espécime e o diâmetro foi mensurado nas direções: médio-lateral e ântero-posterior exatamente na metade do espécime. Foram obtidas três medidas para comprimento e diâmetros (médio-lateral

e ântero-posterior) por um mesmo examinador. A partir destas medidas foi obtida a média de cada grupo.

Os espécimes foram radiografados nas suas metades distais. As imagens foram digitalizadas e foi determinada a região ocupada por tecido ósseo trabecular. Na posição do término do tecido ósseo trabecular, um corte foi realizado no espécime com um disco diamantado montado em aparelho de alta rotação (Extra torque® 603, Kavo do Brasil Ind. Com. Ltda, Joinville, SC, Brasil) sob constante refrigeração em água destilada. A partir deste ponto de corte, foram obtidas secções transversais de 1 mm de espessura (Figura 1) a fim de determinar os percentuais de área óssea cortical e medular. As secções foram observadas em lupa estereoscópica (aumento de 20x), posicionadas com a face de menor diâmetro voltada para a área de visualização. Imagens digitais foram captadas da lupa e a área cortical e medular foi mensurada, três vezes pelo mesmo examinador, por meio do programa Image Tool (v.3.0; UTHSCSA), obtendo-se uma média para cada grupo.

Os dados obtidos geraram médias que foram submetidas à análise de variância (ANOVA). Nível de significância de 5% foi utilizado para todos testes estatísticos.

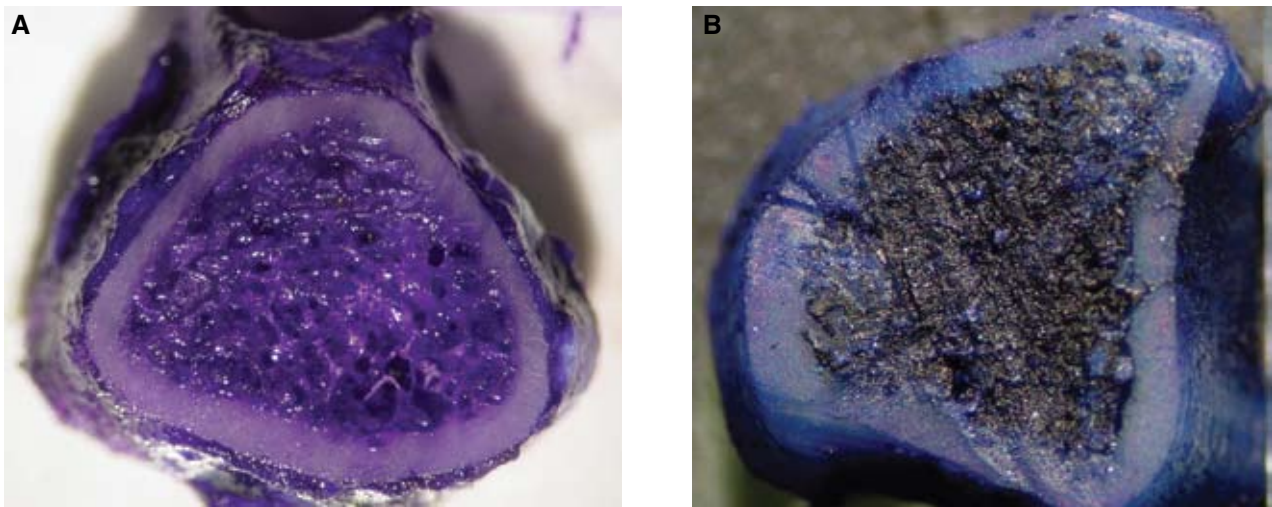


FIGURA 1 – Secção transversal do fêmur (A), secção transversal da tíbia (B).

RESULTADOS

A quantidade média de calorias diárias (kcal/d) ingeridas pelo grupo Gc foi de 44,97 kcal/d, todas provenientes da dieta sólida. Os animais GA1 e de seu grupo isocalórico GI1 consumiram em média 45,32 kcal/d, sendo 11,04 kcal/d, ou seja, 24,36%, provenientes da dieta líquida. Já as ratas de GA2 e de seu grupo isocalórico GI2 consumiram em média 51,72 kcal/d; sendo 20,59 kcal/d oriundas da dieta líquida o que corresponde a 40,10% das calorias totais da dieta.

Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos quanto ao comprimento ($p = 0,6482$;

$p = 0,5296$), diâmetro ântero-posterior ($p = 0,2244$; $p = 0,0982$) e diâmetro médio-lateral ($p = 0,2402$; $p = 0,0788$) tanto para os fêmures quanto para as tíbias, respectivamente. Os valores médios de peso úmido entre os grupos experimentais não diferiram significativamente para fêmures ($p = 0,2844$) e para tíbias ($p = 0,3777$). Esses resultados podem ser observados nas Tabelas 2 e 3.

A análise de variância não verificou diferenças significantes entre os grupos para os valores percentuais de área cortical e medular ($p = 0,1202$; $p = 0,3261$) para fêmures e tíbias, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 2 – Médias e desvio-padrão das medidas (mm) e do peso úmido (g) dos fêmures

Grupo	Comprimento	Diâmetro antero-posterior	Diâmetro médio-lateral	Peso úmido
Gc	36.83 ± 1.00	2.93 ± 0.08	3.85 ± 0.17	0.81 ± 0.08
GA1	36.06 ± 0.91	2.87 ± 0.06	3.82 ± 0.15	0.76 ± 0.08
GI1	36.40 ± 0.94	2.89 ± 0.10	3.79 ± 0.22	0.78 ± 0.08
GA2	36.30 ± 1.23	2.95 ± 0.16	3.93 ± 0.28	0.80 ± 0.09
GI2	36.74 ± 0.93	3.02 ± 0.18	4.03 ± 0.10	0.85 ± 0.04

Tabela 3 – Médias e desvio-padrão das medidas (mm) e do peso úmido (g) das tíbias

Grupo	Comprimento	Diâmetro ântero-posterior	Diâmetro médio-lateral	Peso úmido
Gc	39.26 ± 1.77	3.05 ± 0.24	2.67 ± 0.17	0.60 ± 0.10
GA1	38.77 ± 0.74	2.85 ± 0.26	2.86 ± 0.20	0.55 ± 0.04
GI1	39.36 ± 0.61	3.17 ± 0.19	2.67 ± 0.11	0.58 ± 0.04
GA2	38.79 ± 1.36	3.15 ± 0.13	2.68 ± 0.07	0.59 ± 0.06
GI2	39.81 ± 0.77	3.13 ± 0.18	2.84 ± 0.19	0.67 ± 0.03

Tabela 4 – Médias e desvio-padrão do percentual (%) de área óssea cortical e medular nas tíbias e nos fêmures

Grupo	Tíbia			Fêmur		
	Área cortical	Área medular		Área cortical	Área medular	
Gc	40.16 ± 4.04	59.84 ± 4.04	a*	42.00 ± 2.79	57.99 ± 2.79	A**
GA1	43.52 ± 2.96	56.48 ± 2.96	a	38.54 ± 4.88	61.46 ± 4.88	A
GI1	43.73 ± 3.89	56.27 ± 3.89	a	38.02 ± 3.02	61.98 ± 3.02	A
GA2	44.64 ± 4.44	55.36 ± 4.44	a	39.57 ± 2.76	60.42 ± 2.76	A
GI2	42.94 ± 3.92	57.06 ± 3.92	a	36.35 ± 3.84	63.65 ± 3.84	A

* Letra minúscula: análise de variância para as tíbias.

** Letra maiúscula: análise de variância para os fêmures.

Letras distintas indicam diferença estatística.

DISCUSSÃO

Os efeitos precisos do álcool no esqueleto humano ainda não são bem conhecidos devido à dificuldade de distinção com os efeitos de outros fatores sobre o metabolismo ósseo como pobre status nutricional, redução nos exercícios físicos, perda de peso, presença de pancreatite crônica, hábito de fumar e ocorrência de função hepática anormal. Adicionalmente, a dificuldade de interpretação dos estudos em humanos se deve as amplas variações na idade, duração e padrão de abuso do álcool¹⁶. Devido a isso, o efeito do álcool tem sido estudado extensivamente em modelos animais³⁻⁵.

A ingestão de álcool pode acarretar deficiências nutricionais visto que pode alterar a absorção de várias substâncias^{8,16}. Portanto, estudos que avaliam o efeito do álcool sobre tecidos biológicos devem utilizar um grupo controle nutricional isocalórico para determinar se as alterações observadas são decorrentes da ação do álcool ou da deficiência nutricional gerada pelo seu consumo. Cerca de 90 a 95% do álcool ingerido é metabolizado no fígado e o restante excretado pelos pulmões, rins e sudorese. Para a excreção, a maior parte do álcool é oxidada, sendo que somente 2 a 10% são eliminados na forma integral. Esta oxidação gera energia, convertendo cada grama de álcool em 7,1 kcal. Em alcoólistas, cerca de 40% a 60% das calorias diárias são provenientes do álcool, contudo, são

calorias vazias não associadas a proteínas, minerais ou vitaminas, e não aproveitadas bioquimicamente⁸.

Segundo Hogan et al.⁵ (1999), ratas fêmeas jovens são consideradas aquelas com quatro meses de idade e ratas fêmeas adultas aquelas com sete a treze meses de idade, sendo que estas fases distintas de desenvolvimento repercutem diretamente nos resultados dos estudos. O período experimental do presente estudo foi iniciado com os animais apresentando quatro meses e finalizado com os animais apresentando seis meses de idade, podendo-se considerar a utilização de fêmeas adultas jovens. Sampson¹³ (2002) comparou as idades dos ratos com a dos humanos, indicando que quatro meses nos ratos equivalem a idades em torno de 20 anos e 6 meses a aproximadamente 30 anos.

No presente estudo, utilizando-se ratas adultas jovens, não foram identificadas alterações nos parâmetros avaliados ocasionadas pela administração de dieta alcoólica. Todavia, segundo Turner & Sibonga¹⁵ (2001) nessa fase de desenvolvimento é esperado desequilíbrio no processo de remodelamento, pela ocorrência de redução na formação óssea gerada pelo consumo de álcool, associada a níveis normais de estrógeno.

Assim, pode-se ponderar que na presente pesquisa, os parâmetros morfométricos empregados para mensuração óssea externa e em secção transversal, não foram capazes de identificar a ocorrência de alterações

ósseas nas tíbias ou fêmures decorrente do consumo crônico de álcool nas concentrações de 10% v/v (24,36% de calorias da dieta oriundas do álcool) e 20% v/v (40,10% de calorias da dieta oriundas do álcool) durante oito semanas em ratas adultas jovens.

Hogan et al.⁴ (2001) avaliaram, em ratas de nove meses, os efeitos da dieta alcoólica, durante 8 e 14 semanas, em que 35% das calorias diárias da dieta eram oriundas do álcool. Os autores não verificaram diferenças entre os grupos quanto ao comprimento e peso seco dos fêmures. Contudo, quando outros parâmetros de avaliação foram utilizados (propriedades mecânicas do tecido ósseo medidas por meio de teste de flexão e compressão), o efeito negativo do álcool foi evidenciado.

Resultados similares foram obtidos por Hefferan et al.³ (2003) após avaliarem ratos machos com 6 meses de idade, durante 4 semanas, consumindo dieta alcoólica que correspondia a 35% das calorias diárias da dieta. Estes autores também não observaram diferenças entre os grupos quanto ao comprimento, área de uma secção transversal e área de osso cortical em tíbias. No entanto, quando a cortical óssea das tíbias foi avaliada por histomorfometria foi verificado que o álcool inibiu a formação óssea.

Assim, os recursos de avaliação utilizados no presente estudo e por outros autores parecem apresentar pouca sensibilidade para evidenciar as alterações

ósseas esperadas pelo efeito do consumo crônico de álcool etílico.

Além disso, o período experimental de oito semanas, utilizado na presente pesquisa pode não ter sido suficiente para provocar alterações na estrutura óssea. Hogan et al.⁴ (2001) demonstraram que o consumo crônico de álcool reduz significativamente as propriedades da cortical dos fêmures de ratas adultas, sendo esses efeitos dependentes da duração do uso do álcool, os quais foram evidentes em 14 semanas e com pouca ou nenhuma evidencia em 8 semanas.

Estudos avaliando os efeitos da dieta alcoólica com períodos prolongados de administração de dieta alcoólica devem ser desenvolvidos em ratas fêmeas adultas jovens. A utilização de métodos de avaliação com alta sensibilidade para identificar alterações ósseas decorrentes do consumo de álcool parecem ser fundamentais para o entendimento dos efeitos do alcoolismo sobre os tecidos biológicos.

CONCLUSÃO

O presente estudo não identificou alterações na morfologia dos ossos longos de ratas fêmeas em idade reprodutivas (adultas jovens) submetidas à dieta alcoólica por meio das análises empregadas e no período experimental proposto.

ABSTRACT

The chronic ingestion of alcohol can promote structural alterations in several tissues, besides in the bony tissue. The objective of this study was to evaluate the effect of the ingestion of ethyl alcohol on the morphometry of femurs and tibia in female rats. Forty animals (4 months of age) were divided into 5 groups (n=8) according to liquid diet: water (Control Group - Gc), 10% ethanol solution (GA1), 13.5% sucrose solution (G11), 20% ethanol solution (GA2), 27% sucrose solution (G12). The groups G11 and G12 received controlled diets of same caloric value of the groups GA1 and GA2, respectively. After eight weeks, the animals were sacrificed and the femurs and tibia removed. The humid weight of the specimens was evaluated in analytic scale. The length and diameters (anteroposterior and medium-lateral) were measured with digital caliper. After, radiographs were made in the distal half of the specimens to determine the cancellous bone tissue location. In this area, cross-sections (1 mm) were obtained, in standardized place, in order to evaluate the percentile medium of the cortical bone area and of the marrow bone area. The statistical analysis (ANOVA) didn't showed significant differences ($P>0.05$) for length, medium-lateral diameter, anteroposterior diameter and value percentile of cortical bone area and marrow bone area. It is concluded that the consumption of ethyl alcohol at 10% (that corresponded at 24.36% of the daily calories of the diet) and 20% (that corresponded at 40.10% of the daily calories of the diet) for eight weeks in young adults female rats didn't promote morphologic alterations in the long bone.

UNITERMS

Ethanol; adverse effects; toxicity; bone and bones; femur; drug effects.

REFERÊNCIAS

1. Dyer SA, Buckendahl P, Sampson HW. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol* 1998;16(4):337-41.
2. Gonzalez-Calvin JL, Garcia-Sanchez A, Bellot W, Munoz-Torres M, Raya-Avarez E, Salvatierra-Rios D. Mineral Metabolism, osteoblastic function and bone mass in chronic alcoholism. *Alcohol & Alcoholism* 1993 Sep.;28(5):571-9.
3. Hefferan TE, Kennedy AM, Evans GL, Turner RT. Disuse exaggerates the detrimental effects of alcohol on cortical bone. *Alcohol Clin Exp Res* 2003 Jan.;27(1):111-7.
4. 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.
5. Hogan HA, Groves JA, Sampson HW. Long-term alcohol consumption in the rat affects femur cross-sectional geometry and bone tissue material properties. *Alcohol Clin Exp Res* 1999 Nov.;23(11):1825-33.
6. Klein RF. Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. *Alcohol Clin Exp Res* 1997 May;21(3):392-9.
7. Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. *The Mount Sinai of Medicine* 2000 Jan.;67(1):84-94.
8. Masur J. Farmacologia do álcool etílico. In: Valle LBS, Oliveira Filho RM, DeLucia R, Oga S. *Farmacologia Integrada: fundamentos farmacológicos da terapêutica*. São Paulo: Atheneu; 1991. p.111-7.
9. Modesto Filho J, Azevedo LAP, Azevedo LCP. Tratamento da osteoporose. *J Brás Méd* 1996 nov./dez.;71(5/6):77-9.
10. New SA. Nutritional aspects of bone health: current focus and futures directions. A review of conference in 200/2001. *Nutrition Bulletin* 2002 Mar.;27(1):23-33.
11. Orlic ZC, Raisz LG. Causes of secondary osteoporosis. *J Clin Densit* 1998;2(1):79-92.
12. Pye SR, Adams KR, Halsey JP, Klimiuk P, Knight SM, Pal B, et al. Frequency and causes of osteoporosis in men. *Rheumatology* 2003;42(6):811-2.
13. Sampson HW. Alcohol and other factors affecting osteoporosis risk in women. *Alcohol Res Health* 2002;26(4):292-8.
14. 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.
15. Turner RT, Sibonga JD. Effects of alcohol use and estrogen on bone. *Alcohol Res Health* 2001;25(4):276-81.
16. Turner RT. Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res* 2000 Nov.;24(11):1693 -1701.
17. World Health Organization (WHO). Assessment of fracture risk and its applications to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO Technical Report Series. Geneva: WHO, 1994.

Recebido em: 20/12/05

Aprovado em: 25/04/06

Karla Zanini Kantorski
email: kzkantorski@terra.com.br
Rua Vale Machado 1351
apt. 301- Santa Maria - RS
Fone: (55) 3222-5458