JOSÉ RENATO ROMERO

# “Efeito do alcoolismo crônico sobre a densidade e o reparo ósseo em tíbias de ratos: estudo histométrico e imunohistoquímico”

São Paulo
2012

JOSÉ RENATO ROMERO

# **Efeito do alcoolismo crônico sobre a densidade e o reparo ósseo em tíbias de ratos**: estudo histométrico e imunohistoquímico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Departamento**:
Cirurgia

**Área de Concentração**:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

**Orientador**:
Prof. Dr. Paulo Renato Chopard

São Paulo
2012

Nº CLASSIFICAÇÃO

Nº TOMBO
032978

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
21/11/12

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO**

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2693
FMVZ

Romero, José Renato
Efeito do alcoolismo crônico sobre a densidade e o reparo ósseo em tíbias de ratos: estudo histométrico e imunohistoquímico / José Renato Romero. -- 2012.
84 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Renato Paulo Chopard.

1. Alcoolismo crônico. 2. Densidade óssea. 3. Remodelação óssea. 4. Osteoprotegerina. 5. Fibras colágenas. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*Comissão de Ética no uso de animais*

# CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do alcoolismo crônico sobre a densidade e o reparo ósseo em tíbias de ratos: estudo histométrico e imunohistoquímico", protocolado sob o nº 2476/2011, utilizando 30 (trinta) ratos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Renato Paulo Chopard, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/11/2011.

We certify that the Research "Effect of chronic alcoholism on the density and bone repair in tibia of rats: immunohistochemical and histometric study", protocol number 2476/2011, utilizing 30 (thirty) rats, under the responsibility Prof. Dr. Renato Paulo Chopard, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/23/2011.

São Paulo, 29 de fevereiro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

# FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ROMERO, José Renato

Título: “Efeito do alcoolismo crônico sobre a densidade e o reparo ósseo em tíbias de ratos: estudo histométrico e imunohistoquímico”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

**Data:____/____/____**

**Banca Examinadora**

Prof.Dr._____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof.Dr._____

Instituição:_____ Julgamento: _____

Prof.Dr._____

Instituição:_____ Julgamento: _____

## DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus, conhecedor do meu caminho, das minhas fraquezas mas, acima de tudo guia dos meus passos, alicerce de minha vida. Sempre que me vinha o desânimo, sua luz me irradiava e enchia-me de fé, vontade e esperança.

Ao meu orientador Prof. Dr. Renato Paulo Chopard meus eternos agradecimentos pela confiança depositada em mim e aceite em me orientar mesmo com minhas dificuldades da distância. Sempre esteve presente nos momentos que precisei.

O meu desenvolvimento pessoal durante todo o processo de confecção da dissertação de mestrado foi acompanhado de muitas interrupções. A vida em certos momentos me fez parar, pensar e seguir paralelamente por outros caminhos, mas sempre querendo chegar a essa fase final que aqui estou. A paixão por finalizar esse trabalho foi algo que nunca morreu e mesmo tendo descoberto outros talentos e aptidões no decorrer da caminhada esse é um momento que foi muito esperado. Sentir-me-ei um tanto quanto egoísta se não atribuir créditos às merecidas pessoas que me ajudaram a construir esse sonho.

**“Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto é realidade”**

**Raul Seixas**

À minha segunda casa, a Universidade Guarulhos. Foi aqui que nasci, cresci, colhi frutos e durante todo o processo, viabilizei a realização da parte experimental e de todos os procedimentos. Sem essa oportunidade eu não teria condições de concluir esse projeto.

À Profª. Dra. Marta Bastos pelo grande apoio na realização do procedimento cirúrgico, pela acolhida no laboratório, orientações, críticas, generosidade no empréstimo do material de seu laboratório em todas as etapas desta pesquisa, sem a qual seria impossível a realização desse trabalho.

À Profª. Dra. Poliana Duarte e seus alunos de pós-gradução do curso de Odontologia pela ajuda na realização do procedimento cirúrgico.

Ao responsável pelo biotério da Universidade Guarulhos Prof. Silas Lobo por conceder a liberação da utilização do biotério.

Ao funcionário do biotério da Universidade Guarulhos, Joel, pela colaboração e apoio no que precisei. Minha preocupação com o bem estar dos animais sempre foi acalentada com sua dedicação mantendo o setor apropriado e dando condições adequadas para os animais.

A todos os estagiários e técnicos do laboratório de biologia da Universidade Guarulhos que apoiaram e acompanharam todos os procedimento ficando sempre à disposição.

Ao amigo e técnico de laboratório de histologia, Paulo Simões, pelo livre acesso ao seu setor para a realização de todo processamento do material e ajuda na realização das fotos. Estendo meus agradecimentos à sua esposa e filhos, visto que foram inúmeras vezes sua ausência com eles que se justificou em estar na minha companhia se dedicando a realização desse trabalho.

Ao amigo/irmão Edmilson Duarte pela amizade incondicional, dedicação, presença, apoio, ajuda, descontração e companheirismo sempre!

Ao amigo Dr. Cyro Otonni que viabilizou e realização desse sonho, que me mostrou os caminhos e que mesmo de longe esteve presente em todo processo.

Aos professores e amigos Frederico Martins, Francisco Lins, Elisângela Nunes e Everton dos Santos pelas orientações e palavras de apoio. A convivência com vocês muito me fortaleceu.

Ao Prof. Felipe Borges pela paciência em me auxiliar a caminhar no árduo universo da língua inglesa.

Ao médico veterinário Dr. Fernando Zanonni pela confecção dos pedidos médicos para a compra do material necessário para a realização do procedimento cirúrgico e medicação pós-operatória.

À Profª. Dra. Maria Angelica por ter me recebido e me escutado respeitosamente durante as entrevistas para o egresso no programa de pós-graduação.

À Profª. Dra. Paula de Carvalho Papa e Prof. Dr. José Roberto Kfoury por terem participado de forma exemplar da minha formação durante as disciplinas ministradas por eles. Levarei os exemplos de dedicação e carinho que desprenderam comigo e meus amigos de turma!

A todos os avaliadores que durante os congressos/simpósios realizados nas (FMVZ) unidades de São Paulo e Pirassununga puderam de alguma forma avaliar o desenvolvimento e resultados parciais da dissertação e contribuir construtivamente na melhora do andamento do meu projeto. A visão de vocês nos faz enxergar mais longe!

Ao secretário da pós graduação Maicon Barbosa da Silva (FMVZ) por estar sempre à disposição em esclarecer minhas dúvidas e direcionar-me de maneira correta.

À minha coordenadora da Universidade Guarulhos Profª MS. Roseli Cordeiro por entender e me liberar das atividades curriculares para o término da confecção deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À minha esposa Denise Mariana. Um dia sonhamos juntos e hoje compartilho esse momento contigo. Sei que durante a confecção desse trabalho por vezes te magoei, deixei você estressada; então me perdoe e lembre-se que você é, e sempre será a razão de minha existência.

Aos meus filhos Pedro Romero e Murilo Romero, vocês são o meu maior presente, sem vocês nenhum sonho valeria a pena. Através desse trabalho construirei um futuro melhor para vocês. Talvez isso me acalente em saber que várias vezes tive que deixá-los chorando para me dedicar aos livros.

Aos meus pais João Carlos e Vera Lúcia que sempre me propiciaram uma vida digna, em que eu pudesse crescer nos princípios de Deus, que a honestidade e caráter são fundamentais em nossas vidas, acreditando que tudo é possível, e que desistir nunca seja uma ação contínua; que sonhar e concretizar nossos sonhos só dependerá de nossa vontade.

Aos meus irmãos Alexandre Carlos e Adriano Henrique, minhas cunhadas Fabiana e Claudia e meus respectivos sobrinhos e sobrinhas Maitê, Bruno, Catarina, Enzo e Julia. Vocês me completam!

AMO TODOS VOCÊS!!!

## RESUMO

ROMERO, J.R. **Efeito do alcoolismo crônico sobre a densidade e o reparo ósseo em tíbias de ratos: estudo histométrico e imunohistoquímico.** [Effect of chronic alcoholism on the density and bone repair in tíbia of rats: immunohistochemical and histometric study]. 2012. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

O tecido ósseo tem como característica estar constantemente em plena absorção e recomposição celular, sendo controlado pela interação de RANKL e OPG. No caso da perda de sua continuidade, ou seja, quando ocorre algum defeito ósseo, sua remodelação leva à restauração e consequente integridade do esqueleto, sendo o seu metabolismo influenciado por fatores hormonais, locais, comportamentais, ambientais e nutricionais; e seu desequilíbrio é um dos maiores obstáculos para a eficácia da remodelação óssea, podendo interferir negativamente na consolidação de fraturas. A ingestão crônica de álcool pode contribuir para esse desequilíbrio, e embora correlações significativas venham sendo relatadas entre o consumo excessivo de álcool e a consolidação óssea, novos estudos devem ser desenvolvidos haja vista a grande disparidade entre o tempo de submissão e a quantidade de ingestão do álcool englobando os diferentes protocolos. Os objetivos desse estudo foram avaliar quantitativamente os efeitos do consumo crônico de álcool no peso, reparo ósseo e densidade óssea em ratos Wistar, além de observarmos qualitativamente as fibras colágenas e a expressão de OPG e RANKL. Para isso, separamos aleatoriamente 30 ratos Wistar em dois grupos , sendo (G1) 15 ratos consumindo solução de aguardente diluída em água por 100 dias com concentração progressiva e controlada (10ºGL, 15ºGL, 20ºGL, 25ºGL e 30ºGL) e 15 ratos não alcoólatras consumindo como dieta líquida somente água (G2). Após o 92º dia do período de indução do alcoolismo, ambos os grupos foram submetidos a um defeito ósseo realizado na tíbia com um motor rotacional contendo uma broca com tamanho de 3 mm de diâmetro. Após 8 dias após o procedimento cirúrgico os animais foram eutanasiados em câmara de C02, as tíbias foram removidas e aparadas nas proximidades do defeito ósseo para que fossem processadas através de secções histológicas descalcificadas. A porcentagem de osso neoformado e a

densidade óssea foram avaliadas histometricamente. Através da imunohistoquimica observamos a expressão de OPG e RANKL e através de reação histoquímica pelo método Picro-sirius Red, estudamos o padrão de birrefringência das fibras colágenas. Como resultados, pudemos observar que o peso dos animais, a densidade e remodelação ósseas foram menores no grupo alcoólico. Encontramos também efeitos negativos em relação à qualidade e organização das fibras colágenas, bem como diferenciação na expressão de RANKL e OPG nos diferentes grupos. Nossos resultados demonstram que o protocolo proposto de ingestão de álcool exerce efeitos negativos no ganho de peso e qualidade óssea quando comparado ao grupo controle.

Palavras-chave: Alcoolismo crônico. Densidade óssea. Remodelação óssea Osteoprotegerina.Fibras colágenas

## ABSTRACT

ROMERO, J.R. **Effect of chronic alcoholism on the density and bone repair in tíbia of rats: immunohistochemical and histometric study.** [Efeito do alcoolismo crônico sobre a densidade e o reparo ósseo em tíbias de ratos: estudo histométrico e imunohistoquímico]. 2012.84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.

The osseous tissue features the continuous cellular absorption and recomposition regulated by the interaction of the Receptor activator of nuclear factor kappa- β ligand (RANKL) and Osteoprotegerin (OPG). In case its continuity is lost, that is, any kind of bone injury, its remodeling leads to restoration and consequent skeletal integrity and its metabolism is influenced by hormonal, local, behavioral, environmental and nutritional factors; its imbalance is one of the biggest obstacles to the efficiency of bone remodeling, and it might interfere negatively with fracture healing. The chronic consumption of alcohol may contribute to this imbalance, and, although significant correlations between the excessive alcohol intake and bone consolidation have been reported, new studies must be developed considering the great variety of protocols which approach the time of exposure and quantity of alcohol intake.

The objective of this study was to verify quantitatively the effects of chronic alcohol consumption on body weight, bone healing and density in rats. It was also observed quantitatively the collagenous fibers and the expression of OPG and RANKL. For this purpose, 30 Wistar rats were randomly divided into two groups: G1 (group 1) consisted in 15 rats which had, for 100 days, a liquid diet of liquor diluted in water with a progressive and controlled concentration (10°GL, 15°GL, 20°GL, 25°GL and 30°GL); G2 (group 2) consisted in 15 rats on a liquid diet of only water and free of alcohol. After the 92$^{nd}$ day of the induction period of alcoholism, tibial defects of 3 mm in diameter were created in both groups and after 8 days from this surgery procedure the animals were euthanized in a CO2 chamber. The tibiae were removed and cut next to the bone defect in order to be processed through decalcified histological sections.

The percentage of renovated bone and osseous density were submitted to histometric analysis. Through immunohistochemistry, the expression of OPG and RANKL were analyzed and using Picrosirius red staining method, the birefringence pattern of the collagen fibers was studied. As a result, it was verified that the body weight of the animals, the osseous density and bone remodeling were smaller in G1; negative effects regarding to the collagen fibers quality and organization and a differentiation in the expression of OPG and RANKL were also found in both groups.

Conclusion: these results show that the proposed protocol of alcohol intake produces negative effects in the gain of body weight and bone quality when compared to the control group.

Key words: Chronic alcoholism. Bone density. Bone remodeling. Osteoprotegerin. Collagen fibers.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Consumo total per capita de adultos (15 +) em litros de álcool puro 2005.....28

Figura 2 - Taxas padronizadas de mortalidade (por 100.000 habitantes) por causas básicas ou associadas, plenamente relacionadas ao uso de álcool, segundo regiões. (Brasil, 2000-2006).....29

Figura 3 – Demonstração do Protocolo Cirúrgico.....45

Figura 4 - Fotomicrografia das tíbias dos grupos sem defeito demonstrando as diferenças de densidade óssea entre o grupo controle (A) e grupo Álcool (B).....56

Figura 5 - Fotomicrografia demonstrando as diferenças entre o volume de remodelação óssea nos grupos controle e álcool.....58

Figura 6 - Imunohistoquímica demonstrando maior quantidade de marcações de RANKL (A) em relação às marcações OPG (B) no grupo álcool.....60

Figura 7 - Imunohistoquimica demonstrando quantidades equivalentes de RANKL (A) e OPG (B) no grupo controle.....61

Figura 08 - Prico Sirius Red demonzstrando no grupo álcool (A) predominância de fibras colágenas imaturas (birrefigência esverdeada. Prico Siris Red demonstrando no grupo controle (B) fibras colágenas maduras (birrefigência amareladas/alaranjadas).....62

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Demonstração do peso dos animais dos grupos controle e álcool no início do experimento.....51

Gráfico 2 – Peso dos dois grupos de animais no quadragésimo dia de experimento.....52

Gráfico 3 – Peso dos dois grupos de animais no qüinquagésimo quinto dia de experimento.....53

Gráfico 4 - Centésimo dia de experimento (eutanásia).....53

Gráfico 5 - Evolução do peso dos animais dos dois grupos desde o início do experimento até o centésimo dia.....54

Gráfico 6 – Dados, em porcentagem, da densidade óssea das tíbias sem defeito. A análise estatística demonstrou que a densidade óssea das tíbias do grupo controle é aproximadamente 144% maior do que densidade das tíbias do grupo álcool.....55

Gráfico 7 – Análise estatística das áreas ósseas neoformadas demonstrando remodelação óssea 34% maior no grupo controle.....57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Consumo abusivo de álcool nas capitais (Vigitel, 2008 – Vigilancia de doenças crônicas por inquérito telefônico – ministério da saúde).....31

## SIGLAS E ABREVIATURAS

**$Co_2$** – Gás Carbônico

**CD** – Com Defeito

**DMO** – Densidade Óssea Mineral

**EDTA** – Ácido Tetra-Acético–Etileno-Diamino)

**g** – grama

**GL** – Gay Lussac

**GC** – Grupo Controle

**GA** – Grupo Álcool

**HE** – Hematoxilina e Eosina

**ISO** – International Organization for Standardization

**ml/kg** – Mililitro por quilograma

**mm** – Milímetro

**NIAAA** – National Institute of Alcohol Abuse and Alcoholism

**OPG** – Osteoprotegerina

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PH** – Potencial Hidrogeniônico

**PVPI** – Polivinilpirrolidona Iodo

**µl** - Microlitros

**RANK** – Receptor do Ativador do Fator Nuclear Kappa-β

**RANKL** – Ligante do Receptor do Ativador do Fator Nuclear Kappa-β

**RPM** – Rotações por Minuto

**SD** – Sem Defeito

**SID** – Síndrome de Dependência do Álcool

**TNF** – Fator de Necrose Tumoral

**M-CSF** – Fator de Estimulação da Colônia de Macrófagos

**SUMÁRIO**


1 **INTRODUÇÃO**…….....20
2 **OBJETIVOS**…….....……23
2.1 OBJETIVO GERAL…….....……...24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS…….....……...24
3 **REVISÃO DA LITERATURA**…….....……25
3.1 ALCOOLISMO…….....……26
3.2 TECIDO ÓSSEO…….....……31
3.3 REMODELAÇÃO ÓSSEA…….....34
3.4 ALCOOLISMO NO TECIDO ÓSSEO.....37
4 **JUSTIFICATIVA**…….....39
5 **MATERIAL E MÉTODOS**.....41
5.1 ANIMAIS.....42
5.2 ANESTESIA.....43
5.3 PROTOCOLO CIRÚRGICO.....43
5.4 EUTANÁSIA.....45
5.5 PROCESSAMENTO DOS ESPÉCIMES.....45
5.6 PREPARO DOS CORTES HISTOLÓGICOS.....46
5.7 ANÁLISES HISTOMÉTRICAS.....46
5.8 ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS.....47
5.9 ANÁLISE HISTOQUÍMICA DE PRICO SIRIUS RED.....47
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....48
5.11 OBSERVAÇÕES CLÍNICAS DOS ANIMAIS.....48
6 **RESULTADOS**.....49
6.1 PESO DOS ANIMAIS.....50
6.2 DENSIDADE ÓSSEA.....53
6.3 REMODELAÇÃO ÓSSEA.....56
6.4 IMUNOHISTOQUÍMICA RANKL/OPG.....58
6.5 PRICO SIRIUS RED.....58
7.0 **DISCUSSÃO**.....62
8.0 **CONCLUSÃO**.....69
9.0 **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....71

# 1 - INTRODUÇÃO

O consumo de álcool na sociedade contemporânea é visto predominantemente de forma positiva, pois é uma substância psicoativa legal e socialmente aceita. Conforme dados do Ministério da Saúde do Brasil (2010), essa substância causa a dependência conhecida como alcoolismo, sendo reconhecido como doença pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2004) desde 1948, e representa um dos problemas socioeconômicos mais graves para a saúde mundial.

Uma possível explicação para a disseminação dessa enfermidade pode ser encontrada na facilidade com que o álcool pode ser adquirido, como também o fato de ser uma substância com grande tradição cultural. Estima-se que a dependência dessa droga deva atingir de 10% a 15% da população mundial. O consumo per capita mundial de bebidas alcoólicas, em 2005 chegou a 6,13 litros de álcool puro consumido por todas as pessoas com 15 anos ou mais (SILVA et al., 2011). O consumo excessivo de bebidas alcoólicas ocasiona, além de problemas econômicos, problemas sociais e psicológicos; a estes fatos atribui-se a relevância de se estudar a temática do alcoolismo e suas possíveis causas (BARROS, 2009).

O consumo de bebidas alcoólicas acompanha a história da humanidade. Concomitantemente, pesquisadores têm observado o aumento progressivo da concentração alcoólica destas bebidas. Além disso, estudos epidemiológicos têm detectado índices de consumo cada vez maiores tanto no Brasil, como em outras regiões do mundo, tornando-se patológico e endêmico principalmente após a revolução industrial (MARQUES, 2001; MORAES et al., 2006; LARANJEIRA, et al. 2007).

Com o intuito de simular o alcoolismo em humanos, utilizamos nesse experimento a cachaça Pirassununga 51 ®, produzida pelas Indústrias Muller, líder no mercado nacional e uma das empresas mais importante na produção de cachaça do mundo.

Acompanhando o crescimento do consumo de álcool, os problemas psicobiossociais também crescem a cada ano. Segundo estimativas, 1.8 milhões de óbitos por ano estão relacionados ao uso do álcool (OMS, 2004), e a tendência desses números é aumentar a cada ano.

Quando não levados à morte, indivíduos que consomem essa substância cronicamente sofrem com problemas que são desencadeados em diversos tecidos do corpo humano, dentre eles o tecido ósseo.

A homeostase óssea é afetada pelo consumo inadequado de álcool, que pode desestabilizar o equilíbrio controlado pelo sistema RANK/RANKL/OPG (BOYLE et al., 2003).

Neste sistema, quando ocorre a ligação entre RANK (Receptor do Ativador do Fator Nuclear Kappa-β) e RANKL (Ligante do Receptor do Ativador do Fator Nuclear Kappa-β) temos a formação e atividade dos osteoclastos e, consequentemente, reabsorção de tecido ósseo (BOYLE et al., 2003).

A Osteoprotegerina (OPG) tem a capacidade de regular esse processo de reabsorção pois se liga ao RANK, evitando a ligação entre RANK e RANKL. Quando isso ocorre, a reabsorção óssea é interrompida (YASUDA et al., 1998).

Investigar os padrões de consumo, ou seja, as concentrações, tempo de exposição e frequencia com que essa substância é ingerida, e a relação direta ou indireta com que esse padrão influencia a remodelação e densidade ósseas, é importante para que novas estratégias sejam traçadas para conscientização populacional, além do estimulo a novas pesquisas que contribuam para o conhecimento da fisiopatologia e de novos métodos diagnósticos das doenças decorrentes desse consumo.

# 2 - OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as eventuais alterações morfológicas e histoquímicas no tecido ósseo de ratos submetidos a uma ingestão progressiva e controlada de álcool.

## 2.2 OJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência do álcool sobre o peso corporal;
- Quantificar por histomorfometria a densidade e neoformação óssea nas tíbias;
- Analisar qualitativamente a organização das fibras colágenas nas tíbias;
- Analisar a expressão de OPG e RANKL nas tíbias.

# 3 - REVISÃO DA LITERATURA

## 3.1 ALCOOLISMO

É importante observarmos que o uso excessivo de álcool é tão antigo quanto a história da humanidade, como é citado na Bíblia, no livro de Gênesis 9:20-21: Noé, que era lavrador, plantou a primeira vinha. Bebeu o vinho embriagou-se e ficou nu dentro da tenda.

Independente de ser crônico ou agudo, o consumo do álcool tem o potencial de alterar e prejudicar a saúde e o bem-estar. Além de ser um fator de risco para os eventos que levam à lesões e acidentes, o álcool também leva ao aumento da morbidade e mortalidade (JUNG et al, 2011).

Atualmente o alcoolismo se destaca como um dos mais graves problemas de saúde pública por complicações vindas do plano somático, psíquico e de grande repercussão no meio social. Seu uso excessivo e prolongado causa uma variedade de anormalidades clínicas, bioquímicas e fisiológicas (SANTORUM, 2010).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define o alcoólatra como um bebedor excessivo, cuja dependência em relação ao álcool é acompanhada de perturbações mentais, da saúde física, da relação com os outros e do comportamento social e econômico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

O aumento do risco de abuso de álcool e de outras drogas pode ser justificado com experiências traumáticas na infância, adolescência e na vida adulta. As experiências adversas e traumáticas da vida parecem ter um forte impacto no aparecimento de sintomas, e de um modo específico Arnow (2004) refere que a adversidade durante a infância aumenta a vulnerabilidade para desenvolver psicopatologias, seja na infância ou na idade adulta.

Segundo pesquisa do IBGE (2009), 72% dos adolescentes, de 13 a 15 anos já tomaram alguma bebida com álcool.

Estudos sobre o uso de substâncias psicoativas têm mostrado um panorama ascendente para o consumo de álcool em adolescentes e jovens (GIGLIOTTI, 2004). Por ser uma substância energética, o álcool promove a sensação de saciedade, o que leva a inapetência em associação a distúrbios gastrointestinais que acarretam a má absorção de nutrientes, principalmente se ingerido cronicamente (FAUSTINO, 2003).

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 bioquimicamente (SOUZA, 2007). O álcool não é um nutriente essencial, porém e consumido do mundo todo (MAUREL, 2012).

Embora o consumo de bebidas alcoólicas seja um costume social, pode transformar-se em uma doença fármaco-dependente que até o século passado já atingia mais de oito milhões de pessoas só nos Estados Unidos e nos Países do Reino Unido, e este número pode ser muito maior, uma vez que muitos indivíduos omitem o uso desta substância (ANDREO, 2008).

De acordo com o National Institute of Alcohol Abuse em Alcoholism (NIAAA), cerca de 17,6 milhões de americanos, ou 1 em 12 adultos, fazem uso do álcool ou são alcoólatras e (NATIONAL IINSTITUTE OF HEALTH, 2012) define o alcoolismo como uma doença caracterizada por uma dependência química.

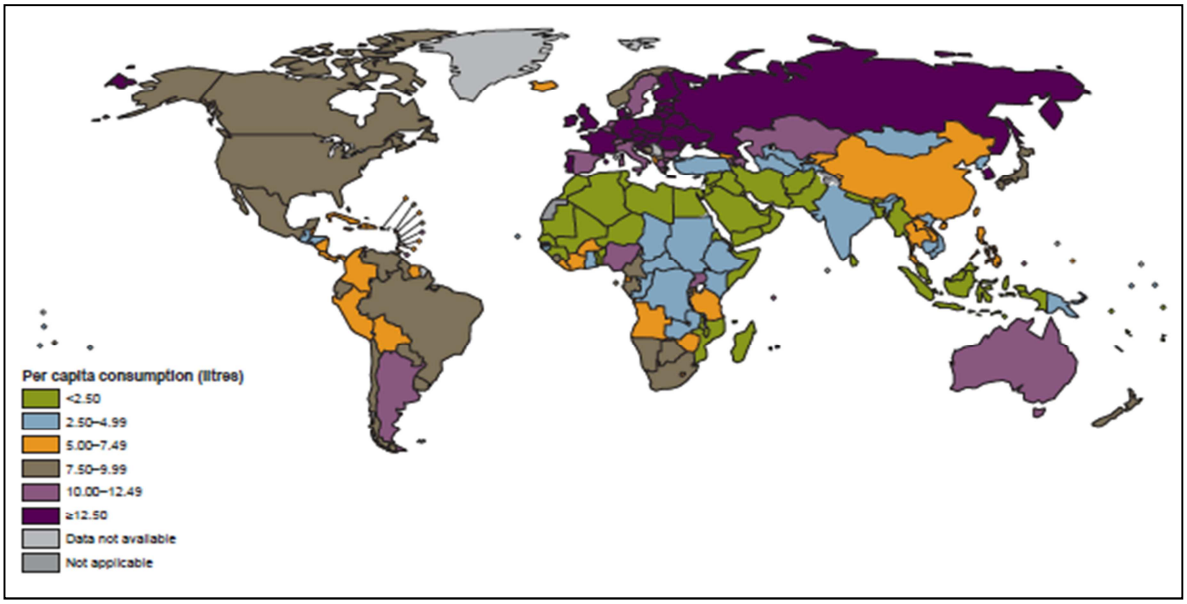
Maurel (2011) afirma que o consumo crônico de álcool é responsável pela morte de aproximadamente 75.000 americanos a cada ano, e o número de mortes e de incapacitados pelo consumo de álcool em todo o mundo equivale a soma dos casos provocados pela pressão alta e pelo fumo (SOMMER, 2012). Aproximadamente 40% de todos os pacientes com traumas ortopédicos estão intoxicados no momento da admissão hospitalar (LEVY et al, 1996).

É uma tarefa difícil o reconhecimento de determinados padrões de consumo como doença, bem como determinar o limite entre o beber socialmente, o uso abusivo ou nocivo de álcool, e o alcoólatra SID (Síndrome de Dependência do Álcool), pois são tênues as diferenças, variam de pessoa para pessoa e existe também a questão cultural (MAUREL, 2012).

Além disso, alguns indivíduos metabolizam o álcool melhor que outros e é possível que ocorra algum tipo de alteração no sistema biológico devido ao consumo frequente e abusivo do álcool ou ao esgotamento do organismo, fazendo com que uma pessoa que, até então, tolerava bem o álcool passe a reagir ao consumo de forma patológica (HECKMANN, 2009).

Segundo Silva et al (2011), os maiores centros de consumo de álcool são encontrados em países desenvolvidos do Hemisfério Norte, principalmente na Europa (Figura 1). Níveis de consumo médios podem ser encontrados em países da África como Namíbia e África do Sul, assim como nos EUA e Brasil.

Figura 1 – Consumo total per capita de adultos (15 +) em litros de álcool puro – 2005



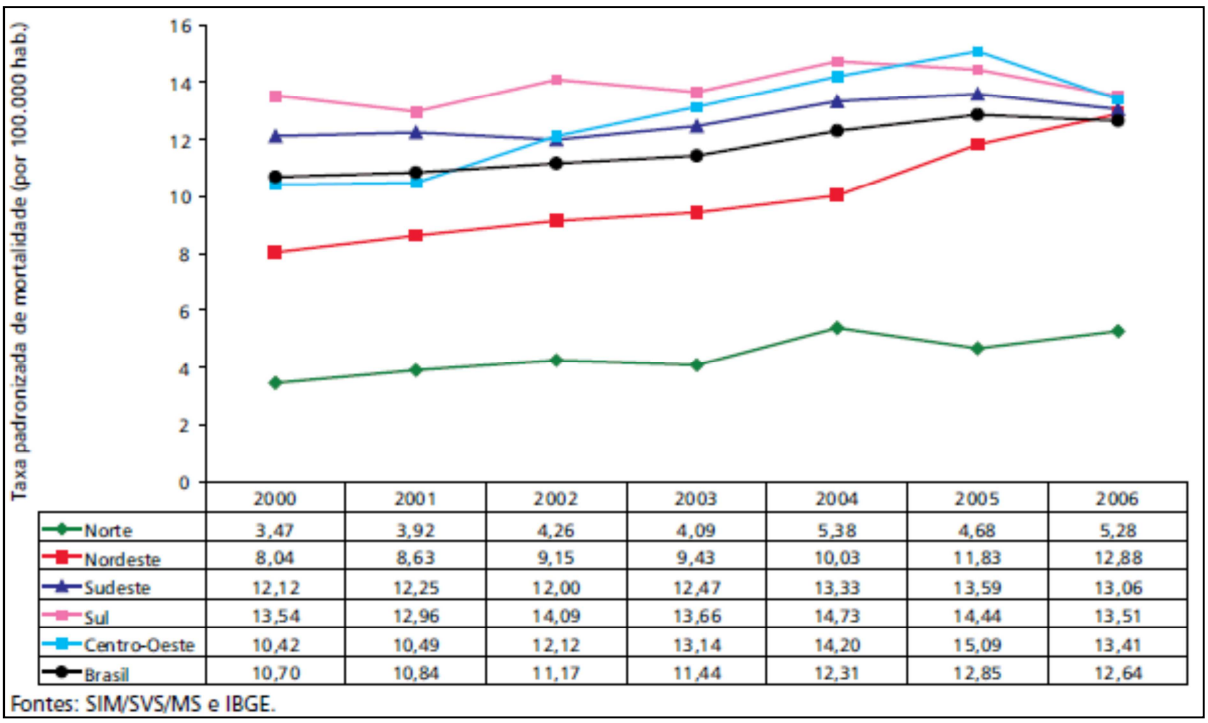

Os níveis mais baixos de consumo estão nos países do norte da África, no leste do Mediterrâneo e do sul da Ásia e do Oceano Índico. Estas regiões representam grandes populações da fé islâmica,e por conta disso, apresentam taxas elevadas de abstenção.

Em relação ao consumo de álcool entre os brasileiros, Silva et al (2011), demonstraram que entre 2000 e 2006 quase noventa e três mil óbitos tinham como causa básica alguma doença plenamente relacionada ao álcool, e aproximadamente cento e quarenta e seis mil óbitos tinham esse grupo de doenças como causa básica e/ou associada.

A taxa padronizada nacional de mortalidade por causas básicas ou associadas ao uso de álcool passou de 10,70 óbitos por 100.000 habitantes em 2000 para 12,64 óbitos por 100.000 habitantes em 2006 (SILVA et al, 2011) (Figura 2).

Na região Nordeste foi observado o maior crescimento das taxas de mortalidade: de 8,04 óbitos/100.000 habitantes em 2000 para 12,88.óbitos/100.000 habitantes em 2006)

Figura 2 - Taxas padronizadas de mortalidade (por 100.000 habitantes) por causas básicas ou associadas, plenamente relacionadas ao uso de álcool, segundo regiões. (Brasil, 2000-2006).




| | 2000 | 2001 | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Norte | 3,47 | 3,92 | 4,26 | 4,09 | 5,38 | 4,68 | 5,28 |
| Nordeste | 8,04 | 8,63 | 9,15 | 9,43 | 10,03 | 11,83 | 12,88 |
| Sudeste | 12,12 | 12,25 | 12,00 | 12,47 | 13,33 | 13,59 | 13,06 |
| Sul | 13,54 | 12,96 | 14,09 | 13,66 | 14,73 | 14,44 | 13,51 |
| Centro-Oeste | 10,42 | 10,49 | 12,12 | 13,14 | 14,20 | 15,09 | 13,41 |
| Brasil | 10,70 | 10,84 | 11,17 | 11,44 | 12,31 | 12,85 | 12,64 |

Fontes: SIM/SVS/MS e IBGE.

Dados do Ministério da Saúde (2006) mostram que a alta incidência de doenças crônicas constitui o principal desafio para o acesso ao atendimento em saúde mental na rede pública. A elevada taxa de dependência de drogas - álcool e outras drogas legais ou ilegais - faz deste o principal problema de saúde pública de nosso país (Figura 3).

Tabela 1 - Consumo abusivo de álcool nas capitais (Vigitel, 2008 – Vigilancia de doenças crônicas por inquérito telefônico – ministério da saúde).

| **Média brasileira** | **19** | **10,5** | **29** |
|---|---|---|---|
| **Capitais / DF** | **Total** | **Masculino** | **Feminino** |
| | **%** | **%** | **%** |
| Aracaju | 19,6 | 33,0 | 8,5 |
| Belém | 23,7 | 37,2 | 12,2 |
| Belo Horizonte | 20,8 | 30,6 | 12,5 |
| Boa Vista | 18,1 | 26,5 | 9,8 |
| Campo Grande | 16,9 | 25,3 | 9,3 |
| Cuiabá | 20,4 | 31,5 | 10,3 |
| Curitiba | 10,7 | 17,8 | 4,6 |
| Florianópolis | 17,0 | 24,3 | 10,5 |
| Fortaleza | 17,6 | 32,4 | 5,5 |
| Goiânia | 17,0 | 28,5 | 7,0 |
| João Pessoa | 20,0 | 34,2 | 8,3 |
| Macapá | 20,6 | 36,4 | 5,7 |
| Maceió | 15,8 | 24,9 | 8,2 |
| Manaus | 18,7 | 28,3 | 9,9 |
| Natal | 17,6 | 27,2 | 9,6 |
| Palmas | 23,7 | 36,3 | 11,0 |
| Porto Alegre | 15,5 | 21,7 | 10,3 |
| Porto Velho | 18,5 | 26,9 | 10,3 |
| Recife | 19,3 | 29,2 | 11,2 |
| Rio Branco | 16,6 | 24,6 | 9,2 |
| Rio de Janeiro | 20,5 | 28,6 | 13,8 |
| Salvador | 24,9 | 35,7 | 15,9 |
| São Luís | 19,9 | 32,1 | 9,8 |
| São Paulo | 12,3 | 18,2 | 7,1 |
| Teresina | 21,4 | 36,3 | 9,2 |
| Vitória | 18,5 | 27,6 | 10,8 |
| Distrito Federal | 18,6 | 27,0 | 11,2 |

*Consumo abusivo: mais de 5 doses para homem ou mais de 4 doses para mulher em pelo menos uma ocasião nos últimos 30 dias.

## 3.2 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo tem importante papel no suporte, proteção e locomoção dos vertebrados e está sob o controle de fatores sistêmicos, como os hormônios; e fatores locais, como os fatores de crescimento e as citocinas (ANDIA, 2006).

Dentre as funções do tecido esquelético, encontramos:

- Suporte: o esqueleto fornece suporte estrutural para todo o corpo. Ossos individualmente ou em grupos dão estrutura e proteção para tecidos moles e órgãos;
- Depósito de minerais e lipídios – o tecido ósseo tem a função de estocar minerais e íons inorgânicos que contribuem para a osmolaridade dos fluidos corporais. Estes íons e minerais participam de vários processos fisiológicos, inclusive como co-fatores enzimáticos. Os sais de cálcio do osso representam uma valiosa reserva mineral que mantém as concentrações normais dos íons cálcio e fosfato nos fluidos corporais (o cálcio é o mineral mais abundante no corpo humano). O esqueleto estoca energia ao armazenar lipídios nas áreas da medula óssea amarela.
- Produção de células sanguíneas – as células vermelhas e brancas do sangue, bem como outros elementos sanguíneos são produzidas na medula óssea vermelha que preenche a cavidade interna de muitos ossos.
- Proteção – muitos órgãos e tecidos delicados são cercados por elementos esqueléticos. O tórax protege o coração e os pulmões, o crânio engloba o cérebro, as vértebras protegem a medula espinhal e a pélvis embala delicadamente os órgãos dos sistemas reprodutivo e gastrointestinal
- Sistema de alavancas – muitos ossos funcionam como alavancas que podem alterar a magnitude e direção das forças geradas pelos músculos esqueléticos. O sistema de alavancas multiplica a força gerada durante as contrações musculares, transformando-as em movimentos corporais. Os movimentos variam da delicadeza motora da flexão de um dedo a movimentos vigorosos nas alterações do corpo como um todo (Martini, 1998).

Também se caracteriza por ser uma forma especializada de tecido conjuntivo constituído por uma fase mineral, formada essencialmente por cristais de fosfato de cálcio sob a forma de hidroxiapatita, assentado numa organizada matriz colágena. A

combinação da fase mineral e da fase orgânica conferem ao tecido ósseo propriedades únicas, que o tornam muito resistente às solicitações mecânicas (Judas, 2012).

A estrutura mineralizada do osso é revestida por envoltórios de periósteo e de endósteo. Os canais vasculares, no interior do osso compacto, são continuações dos envoltórios de periósteo – envoltório endocortical ou harvesiano. Estes envoltórios englobam dois fatores importantes: o potencial osteogênico e a vascularização abundante, permitindo a eles participar das atividades modeladoras e remodeladoras como também no reparo ósseo (BUSER; DAHLIN; SCHENK, 1996).

O periósteo, por sua vez, envolve a superfície externa dos ossos, com exceção das superfícies articulares, do tendão e das inserções ligamentares. Sua estrutura varia desde delicadas lâminas do tecido conjuntivo frouxo a membranas fibrosas densas. As células osteoprogenitoras estão localizadas, em geral, nas vizinhanças dos vasos sanguíneos, perto de uma superfície óssea. As células do endósteo pertencem ao estroma da medula óssea ou são derivadas de osteoblastos latentes, os quais constituem a fonte principal das células basais, nos canais corticais (SCHENK et al, 1992).

As populações de células assumem diversas formas e designações, com base na sua diferente morfologia, atividade e localização em relação à matriz calcificada. Estas células podem ser agrupadas em duas séries diferentes: células da linha osteoblástica, responsáveis pelo processo de formação da matriz óssea e células da linha osteoclástica, relacionadas com a sua reabsorção (Judas 2012)

Macroscopicamente pode se apresentar como compacto na região mais periférica dos ossos, denominada cortical, e esponjoso ou trabecular, com rede de trabéculas contendo espaços intercomunicantes que abrigam a medula óssea. As superfícies ósseas internas e externas são revestidas respectivamente pelo endósteo e periósteo. O periósteo constitui membrana de grande importância para a integridade dos ossos (JUDAS, 2012).

As anormalidades da homeostasia dos componentes que constituem os ossos, como por exemplo o cálcio e o fósforo, podem ser desencadeadas por alterações metabólicas, nutricionais e hormonais (MOE, 2008). Para manter a homeostasia o esqueleto tem que atender à sua própria integridade estrutural, através da contínua remodelagem e renovação, e tem que responder às necessidades sistêmicas.

Os principais agentes na modificação da matriz óssea são os osteoblastos e os osteoclastos. O osteoblasto produz a matriz cartilaginosa, que sofre mineralização a qual, por sua vez, poderá ser removida pela atividade dos osteoclastos quando ativado.

O osso está em constante remodelação, num processo complexo que envolve a reabsorção do osso pelos osteoclastos, seguida por uma fase de formação óssea promovida pelos osteoblastos (FROST, 1964). Cerca de 20% do tecido ósseo é renovado anualmente por remodelação.

Os ossos sofrem permanente deposição de osteoblastos e ininterrupta absorção nos locais onde os osteoclastos se encontram ativos. Essa deposição e a absorção de tecido ósseo apresentam diversos aspectos funcionais fisiologicamente importantes. Em primeiro lugar, o osso costuma ajustar sua resistência proporcionalmente à intensidade do estresse ósseo. Como resposta a essas forças, os ossos aos poucos sofrem espessamento quando submetidos a cargas pesadas. Em segundo lugar até mesmo a morfologia do osso pode ser reajustada para uma sustentação apropriada das forças mecânicas por meio da deposição e reabsorção ósseas em conformidade com os padrões de estresse. Em terceiro lugar, como o osso antigo se torna relativamente quebradiço e frágil, há necessidade de deposição de uma nova matriz orgânica à medida que a matriz orgânica sofre degeneração. Desse modo, a resistência normal do osso é preservada (GUYTON, 2006).

Quando lesados, têm capacidade regenerativa, isto é, o processo de reparação óssea é efetuado através da formação de osso novo e não pela formação de tecido fibroso (JUDAS, 2012).

O osso é o principal reservatório de cálcio do organismo, e como as concentrações de cálcio no sangue devem se manter em limites muito estreitos, tem de haver homeostase do cálcio para que os ossos desempenhem um papel fundamental nos processos de formação, reabsorção, manutenção e remodelação óssea. Participam dessa homeostase quatro tipos celulares distintos que derivam de duas linhagens: uma relacionada à formação e manutenção: osteoblastos, células de revestimento ósseo e osteócitos, e outra à reabsorção: osteoclastos (ANDIA, 2006).

## 3.3 - REMODELAÇÃO ÓSSEA

A remodelação óssea é um mecanismo que mantém o esqueleto em renovação pelo processo de troca do osso velho que é substituído pelo osso novo.

O tecido ósseo, em diversos momentos, precisa modificar sua forma ou estrutura. Seja para um osso primário (primeiro tecido ósseo formado) tornar-se maduro, para crescer mantendo sua forma, para um osso esponjoso tornar-se compacto ou para se adaptar a novas situações fisiológicas ou patológicas. O osso está em constante remodelação, por meio de reabsorção e deposição de matriz óssea, que são processos estreitamente acoplados (KLEIN, 1997; ANDIA, 2006;).

No processo de remodelação ocorrem duas atividades opostas, mas complementares: a formação e a reabsorção do tecido ósseo a cargo das células das linhas osteoblástica e osteoclástica. Desta forma, elimina-se uma porção de osso velho, substituindo-o por osso novo, com pouca ou nenhuma alteração da massa óssea e assegura-se, também, a substituição de osso imaturo por osso lamelar (JUDAS, 2012).

O ciclo da remodelação óssea inicia-se pela reabsorção do osso velho, recrutamento dos osteoblastos, deposição de nova matriz e mineralização desta nova matriz depositada. Para cada quantidade de osso reabsorvida outra é formada na mesma proporção, de modo a manter constante a massa óssea. Em adultos normais, há equilíbrio entre a quantidade de osso reabsorvido pelos osteoclastos e a quantidade de osso formado pelos osteoblastos (FROST, 1991). O que parece ocorrer, ao longo da vida, é uma imperceptível perda na formação a cada ciclo, provocando assim, uma perda óssea como resultado de inúmeros ciclos deficientes (HILL; ORTH, 1998).

O conjunto dos processos de depósito e reabsorção denomina-se remodelação óssea. Estes dois processos estão associados, formando conjuntos de osteoclastos e osteoblastos, que são as unidades de remodelação. Num adulto normal há um equilíbrio entre estes dois processos – a quantidade reabsorvida é igual à depositada. A remodelação não é uniforme – por exemplo a parte distal do fêmur é totalmente remodelada a cada seis meses enquanto que a diáfise é remodelada muito mais lentamente.

Em todos os casos, a reparação óssea é um processo altamente regulado, que envolve estágios sobrepostos:

- O trauma da fratura óssea rompe vasos sanguíneos associados; o coágulo sanguíneo resultante cria uma malha de fibrina de sustentação para recrutar células inflamatórias, fibroblastos e endotélio. Plaquetas desgranuladas e células inflamatórias de limpeza, subsequentemente, liberam um grande número de citocinas que ativam células progenitoras dos ossos, e aproximadamente em sete dias o tecido envolvido é preparado para nova síntese de matriz. Este calo ósseo de tecido mole é capaz de juntar as extremidades do osso fraturado em aposição, mas não é calcificado e não consegue suportar peso.

- Os progenitores dos ossos na cavidade medular depositam novos focos de osso trançado, e células mesenquimais ativadas no local da fratura se diferenciam em condroblastos sintetizadores de cartilagem. Em fraturas não-complicadas, este processo inicial de reparo tem seu pico entre quatorze e vinte e um dias. A cartilagem recém-formada atua como um ponto de origem para ossificação endocondral, recapitulando o processo de formação óssea nas placas epifisárias de crescimento. Isto conecta a trabécula ao osso adjacente. Com a ossificação, as extremidades fraturadas são ligadas por um calo ósseo.

- Apesar de um excesso de tecido fibroso, cartilagem e osso serem produzidos no calo inicial, um suporte de peso subseqüente leva a reabsorção do calo por locais não estressados; ao mesmo tempo existe fortificação das regiões que suportam maiores cargas. Esta remodelação do calo restaura o tamanho e a forma original do osso, incluindo a arquitetura esponjosa da cavidade medular.

- A reparação óssea será obviamente reduzida por níveis inadequados de cálcio ou fósforo, deficiência de vitaminas, infecções sistêmicas, diabetes e insuficiência vascular. (ROBBINS, 2008).

Os estudos desses estágios citados acima estão sendo cada vez mais estudados, porém o entendimento completo dos mecanismos de controle da remodelação não está completamente elucidado, fazendo com que exista um grande número de novas descobertas.

No centro destas novas descobertas está a aceitação de que novos membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) interferem na função dos osteoclastos. A gênese se inicia com o RANK, (um membro da família do TNF da superfície celular), receptor ativador do fator nuclear Kb. Este nome deriva da habilidade do receptor em ativar a cascata transcricional NFkB nas células que albergam RANK; dentre as células que expressam RANK, estão incluídos os macrófagos. O RANK é ativado pela interação com o RANKL (ligante) que é sintetizado e expressado pelas células do estroma ósseo e osteoblastos.

As células do estroma ósseo e osteoblastos também produzem uma citocina chamada fator de estimulação da colônia de macrófagos (M-CSF), que se liga a um receptor de superfície celular distinto de macrófagos. Juntos, o ligante de RANK e M-CSF associam-se para converter macrófagos em osteoclastos que por sua vez absorvem osso. A ativação de RANK é, portanto, o estímulo principal para a reabsorção óssea. A atividade reabsortiva induzida pelo caminho RANK-RANK ligante é regulada por uma molécula chamada osteoprotegerina (OPG), também secretada pelos osteoblastos e células do estroma. A OPG é um receptor “isca” que pode se ligar aos ligantes de RANK e, assim, encurtar o circuito da sua interação com o RANK. A ligação do ligante de RANK à OPG, ao invés do RANK, restringe a formação de osteoclastos e a atividade de reabsorção óssea. A desregulação da interação entre RANK, RANK ligante e OPG é, provavelmente, um dos principais causadores da patogenia caracterizada pelo aumento da porosidade do esqueleto e da redução da massa óssea, a osteoporose. Ela está associada ao aumento da fragilidade óssea e a suscetibilidade a fraturas. A desordem pode ser localizada em um determinado osso ou região, como na osteoporose por desuso de um membro, ou pode envolver todo o esqueleto, sendo uma doença óssea metabólica. A osteoporose generalizada pode ser primária ou secundária associada a uma grande variedade de condições, dentre elas o consumo excessivo de álcool (ROBBINS, 2008).

## 3.4 - ALCOOLISMO NO TECIDO ÓSSEO

Os efeitos do uso abusivo e prolongado do álcool sobre vários tecidos, incluindo o ósseo, têm sido amplamente estudados.

Em 1965 foi descrito pela primeira vez que o consumo de álcool é um fator potencial para a osteoporose e fraturas osteoporóticas (SAVILLE, 1965).

A quantidade de defeitos ósseos criados cirurgicamente e pelos vários tipos de acidentes tem aumentado e existe uma preocupação muito grande ao reparo desses defeitos, associados ao alcoolismo (BUCHAIM, 2009).

Lodi (2009) relaciona o alcoolismo com a redução da massa óssea, e ao aumento de risco de fraturas. Ocorrendo a fratura, o reparo ósseo pode sofrer atrasos.

Buchaim (2005) descreve que os efeitos do álcool no tecido ósseo são menos conhecidos, mas sabe-se que em longo prazo o seu uso excessivo também afeta esse tecido e pode exercer uma importante função na causa de extensas perdas ósseas.

Em 1965 foi descrito pela primeira vez que o consumo de álcool é um fator potencial para a osteoporose e fraturas osteoporóticas (SAVILLE, 1965).

Os fatores de risco modificáveis para a redução da massa óssea, associada a um desarranjo da microarquitetura do osso, e que levam à osteoporose são: fumo, abuso de bebidas alcoólicas, dieta pobre em cálcio, hipovitaminose D, quedas frequentes, imobilização prolongada e sedentarismo (CAVALHEIRO, 2009). Em estudo anterior, Cavalheiro et al. (2007) observaram que o álcool pode alterar o processo de remodelação óssea de forma direta ou indireta. A ação direta é verificada através do efeito antiproliferativo sobre os osteoblastos, e a indireta pela modulação de hormônios reguladores do metabolismo (metabólitos da vitamina D, hormônios das paratireóides e calcitonina) presença de doenças hepáticas e deficiências nutricionais.

O consumo de álcool aumenta o risco de incorrer em uma lesão traumática (SAVOLA et al., 2005), está associado a uma maior incidência de complicações clínicas após trauma ortopédico (LEVY et al., 1996), e tem também um efeito inibitório sobre o processo de reparação de fraturas (JANICKE-LORENZ; Lorenz, 1984).

Estudos têm demonstrado que o consumo excessivo de bebidas alcoólicas provoca alterações metabólicas e patológicas em diferentes sistemas orgânicos. No tecido ósseo é sabido que o álcool provoca osteoporose, inibe a síntese de tecido ósseo e altera o metabolismo das células ósseas (PEREIRA, 2007).

Em longo prazo, o uso de álcool tem sido mostrado como efetuador de efeitos diretos e indiretos sobre a remodelação óssea, levando a redução da densidade mineral óssea (DMO) e aumento do risco de fraturas (SAMPSON, 1998).

Sommer (2006) demonstrou em seus resultados que baixa ou moderada ingestão de álcool podem exercer efeitos protetores sobre a saúde óssea de mulheres idosas.

Em contraste com estes efeitos nocivos do abuso de álcool, vários estudos têm relatado que o moderado uso de álcool pode diminuir as taxas de fratura óssea e aumentar densidade, principalmente em mulheres na pós-menopausa. No entanto, outros mostraram nenhuma associação significativa entre a ingestão do álcool DMO.

Apesar destes estudos, pouco se sabe sobre os mecanismos do álcool e os seus efeitos sobre o reparo de fratura óssea.

# 4 - JUSTIFICATIVA

Recentes pesquisas têm demonstrado que o consumo crônico e contínuo de bebidas alcoólicas vem aumentando consideravelmente pelo homem moderno, e que essa conduta pode afetar negativamente a homeostase tecidual. A partir desses dados parece ser importante novos estudos controlados para se obter mais resultados que nos esclareçam esses mecanismos. Saliento a imensa importância em trabalhar com modelos animais que se aproximam do padrão humano, para um maior entendimento sobre os efeitos provocados pelo consumo crônico do álcool, uma vez que este acarreta inúmeros problemas sociais, econômicos, físicos e psíquicos.

# 5 - MATERIAL E MÉTODOS

## 5.1 Animais

Todos os experimentos conduzidos neste estudo foram previamente aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, Campus São Paulo (número do protocolo: 2476/2011).

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus, albinus*) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Universidade Guarulhos, com peso médio de 185 gramas, livres de quaisquer patologias, mantidos em caixas acrílicas forradas com maravalha limpa e apropriada, recebendo "*ad libitum*" ração padrão para roedores, em ambiente com temperatura controlada em torno de 23°C e fotoperíodos de claro e escuro de 12 horas.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos assim determinados: G1 (15 ratos alcoólatras submetidos ao defeito ósseo), G2 (15 ratos não alcoólatras submetidos ao defeito ósseo).

O grupo alcoólatra (G1) recebeu como dieta líquida (método semi-voluntário) aguardente de cana (Pirassununga 51 ®, 39º GL, Indústrias Muller, Pirassununga, SP, Brasil) diluída em água com concentração controlada e progressiva conforme segue:

| Tempo de indução (dias) | Concentração da aguardente |
|---|---|
| 15 dias | 10º GL |
| 15 dias | 15º GL |
| 10 dias | 20º GL |
| 10 dias | 25º GL |
| 50 dias | 30º GL |

O grupo não alcoólatra (G2) recebeu como dieta líquida somente água "*ad libitum*"

## 5.2 Anestesia

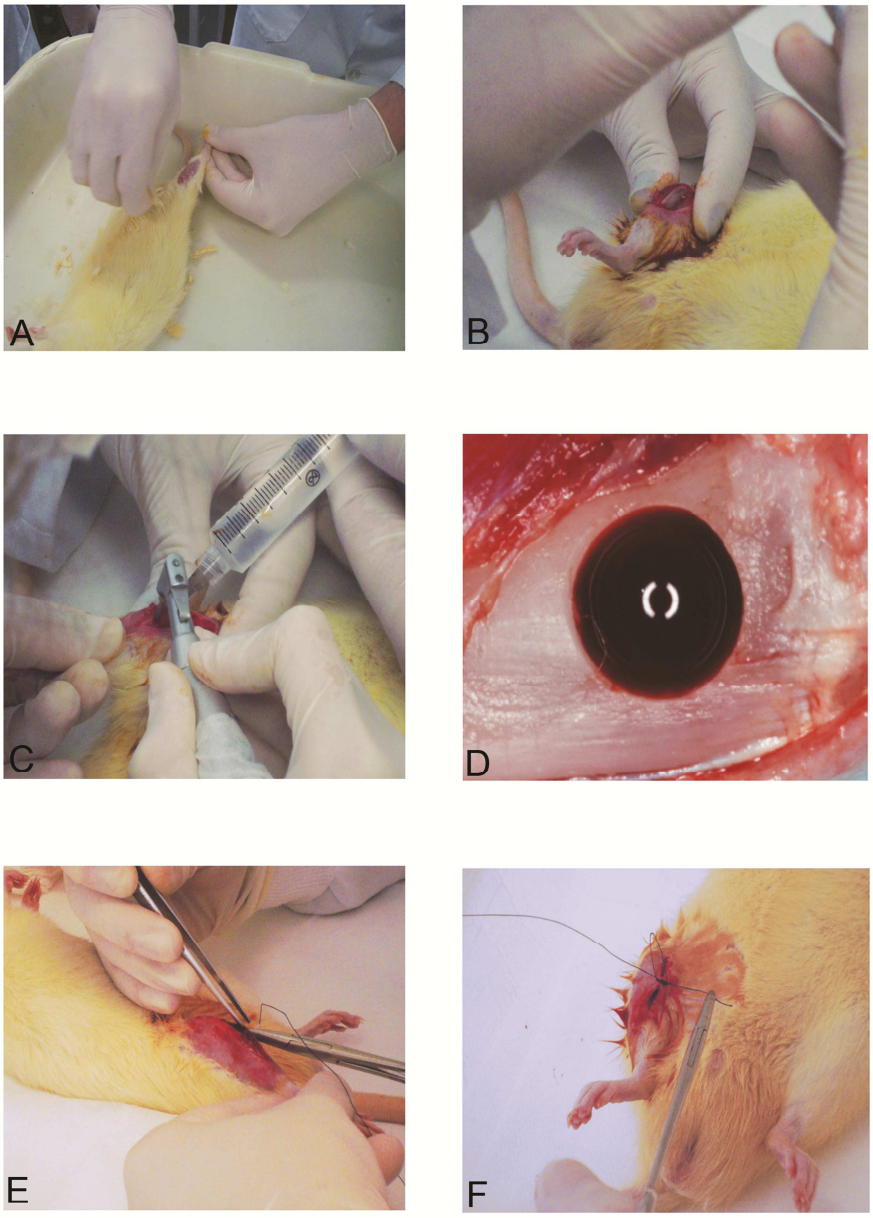
Para a realização do defeito ósseo, os animais foram anestesiados com solução de Cloridrato de Ketamina numa dose de 30 mg/Kg e como sedativo, analgésico e relaxante muscular, o Cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4-H-1,3-tiazina a 2% numa dose de 12 mg/Kg. As drogas foram administradas em dose única e por via intra-peritoneal. Com essa combinação e nessa posologia conseguiu-se uma narcose profunda que durou aproximadamente entre 1 hora e 1 hora e trinta minutos, tempo suficiente para a realização de todos os procedimentos cirúrgicos.

## 5.3 Protocolo Cirúrgico

Para a realização do procedimento cirúrgico utilizamos o seguinte protocolo:

1. Anestesia geral;
2. Tricotomia realizada manualmente na área da intervenção;
3. O animal foi repousado sobre um campo cirúrgico estéril;
4. Anti-sepsia do pêlo do animal com iodopovidona (PVPI - polivinilpirrolidona-iodo) em uma área ligeiramente maior que a área cirúrgica
5. Incisão da pele
6. Incisão da fáscia muscular;
7. Afastamento da musculatura até alcançar o periósteo da tibia;
8. Incisão e descolamento do periósteo;
9. Por meio de um motor elétrico, contra-ângulo redutor 16:1 (1000 rpm) e broca numero 3 foi realizado o defeito ósseo;
10. Sutura por camadas realizada com fio mononylon 4-0 no periósteo, de forma a recobrir a loja óssea; e sutura contínua na fáscia muscular. Na pele realização de sutura em pontos isolados.
11. Manutenção do animal em leito aquecido (37ºC) e sua observação até o retorno da sedação.

Figura 3 - Demonstração do protocolo cirúrgico




Legendas: A - Tricotomia manual do local da cirurgia; B - Assepsia e exposição do tecido; C - Confecção do defeito ósseo; D - Tíbia perfurada; E - Sutura do periósteo; F - Sutura final.

A medicação pós-cirúrgica (dia seguinte à cirurgia) foi utilizada para evitar possíveis dores e processos inflamatórios. Para tal, utilizamos antiinflamatório e analgésico flunixin (Banamine injetável 10mg – Schering Plough Veterinária) ministrado via subcutânea na dosagem de 0,2 ml/kg e um antibiótico composto pela associação de benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica, diidroestreptomicina base (sulfato) e estreptomicina base (sulfato) (Pentabiótico veterinário pequeno porte – Fort Dodge) na dosagem de 1ml/Kg ministrado por via intramuscular. Os animais foram monitorados em seu período pós-operatório quanto a sinais de complicações tais como dor, desconforto e infecção, e quando não fora observada nenhuma delas, foi dispensado conduta medicamentosa complementar.

Durante todo o período pós-operatório os animais foram mantidos em suas gaiolas.

## 5.4 - EUTANÁSIA

Passados 100 dias após o início do estudo (8 dias após a confecção do defeito ósseo), os animais foram eutanasiados em câmara de $CO_2$. As tíbias foram removidas e aparadas nas proximidades do defeito ósseo para que fosse analisado o volume de osso neoformado. As tíbias contra laterais foram também removidas para que se pudesse analisar a densidade óssea, a quantidade de OPG/RANKL, bem como a qualidade das fibras colágenas.

## 5.5 - PROCESSAMENTO DOS ESPÉCIMES

Oito dias após criação do defeito os animais foram eutanasiados e os espécimes foram processados para obtenção de secções histológicas descalcificadas. A área de osso neoformado da tíbia direita (medidas em $mm^2$) e a densidade óssea da tíbia esquerda (%) foram avaliadas histometricamente. Algumas secções histológicas das tíbias esquerdas foram aleatoriamente selecionadas para análise imunohistoquímica dos mediadores osteometabólicos: osteoprotegerina

(OPG), o ligante do receptor-ativador do fator NF-κβ (RANKL), e através do método Pricu Sirius Red foram analisadas as fibras colágenas dos grupos sem defeito.

## 5.6 - PREPARO DOS CORTES HISTOLÓGICOS

Os cortes histológicos foram fixados em uma solução contendo glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato com 7% de sacarose (pH 7.4) por 4 horas a 4ºC. Após o processo de fixação e posterior lavagem em água destilada por 24 horas a 4ºC, os cortes foram descalcificados em uma solução de EDTA a 4,13% em tampão tris-HCl pH 7,4 a 4ºC por um período de 60 dias. Em seguida, os mesmos foram desidratados em uma série crescente de solução de álcool etílico (60 - 100%) sob constante agitação. As peças foram então diafanizadas em xilol e incluídas em blocos de parafina. Desses blocos, foram obtidas secções seriadas de cerca de 4 μm de espessura que posteriormente foram coradas por hematoxilina e eosina (HE). As tíbias com e sem defeito foram cortadas no sentido transversal para que fossem observados o osso medular e o cortical. Alguns cortes foram destinados às análises imunohistoquímicas e histoquímicas.

## 5.7 - ANÁLISES HISTOMETRICAS

As secções histológicas coradas com HE foram digitalizadas e por meio de software (Image-Pro®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EUA), foram analisadas a área de osso neo-formado dentro do defeito realizado. As quantidades de osso neo-formado foram calculadas circundando a área da região de interesse, com o auxílio de uma ferramenta do próprio programa de computador.

A densidade óssea na tíbia foi avaliada com o auxílio de um retículo quadriculado (contendo aproximadamente 314 pontos) sobre o qual foi feita a contagem dos pontos coincidentes com osso em relação à quantidade de pontos total (densidade (%) = 100 x pontos com osso/314).

## 5.8 - ANÁLISES IMUNOHISTOQUÍMICAS

Por meio de imunohistoquímica, foram detectadas as moléculas de OPG e RANKL, importantes mediadores envolvidos no metabolismo ósseo. Lâminas previamente silanizadas contendo algumas secções histológicas foram tratadas com uma solução de peróxido de hidrogênio a 3% durante 30 minutos para neutralização da peroxidase endógena. Em seguida, para bloqueio das reações inespecíficas, as secções foram tratadas com solução de soro albumina bovina a 1%, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem em solução com solução de PBS-Triton X100, as secções foram incubadas com os anticorpos primários (anticorpos policlonais anti OPG e RANKL) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) durante 24 horas a 4ºC. Os anticorpos secundários biotinilados permaneceram em contato durante 60 minutos a temperatura ambiente e seqüencialmente com avidina fosfatase alcalina (Kit Vecstain ABC-AP, Vector Laboratories). O produto da reação foi visualizado com a adição de 3,3' diaminobenzidina e as secções foram coradas com HE. Os cortes foram digitalizados e analisados por microscopia óptica. Foi realizada a verificação das células marcadas com o respectivo anticorpo na cortical óssea (Onuma, 2011).

## 5.9 - ANÁLISE HISTOQUÍMICA DE PRICO SIRIUS RED

Os cortes foram desparafinados em xilol, hidratados em gradientes decrescentes de etanol. Posteriormente foi realizado o bloqueio da elastina com o ácido fosfomolibídico a 0,2% por 10 minutos. Após as lavagens em água destilada os cortes foram imersos por 90 minutos em solução de Sirius Red a 0,1% dissolvido em ácido pícrico aquoso saturado. Em seguida, os cortes foram lavados em HCl 0,01 Normal durante 2 minutos. Depois as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, diafanizadas em xilol e montadas com Entellan®.

Fotomicrografias por grupo sem defeito dos cortes das tibias foram documentadas por um microscópio de luz polarizada (Axiolab Standard 20, Carl Zeiss), acoplado a uma videocâmera de alta resolução (AxionCam, Carl Zeiss) e analisadas.

## 5.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística, os dados obtidos foram expressos em Média. Os grupos foram comparados por meio do teste t student seguida pelo teste de Tukey para observar se ocorreram diferenças entre os grupos. O nível de significância para a rejeição da hipótese nula foi de $p \leq 0,05$. Para todos os testes utilizou-se o software *GraphPad Prism* 5.0, San Diego, California USA.

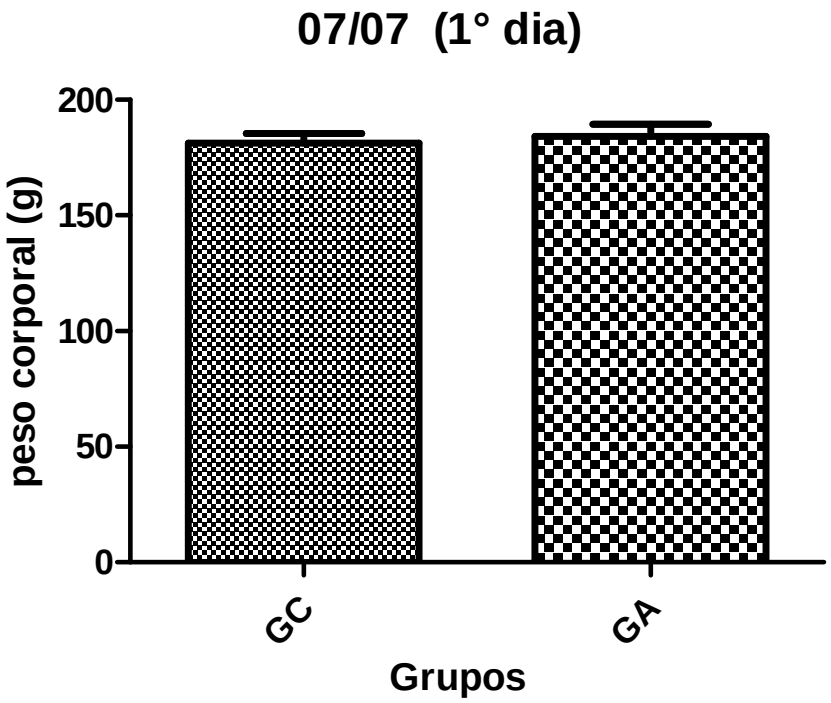
## 5.11 - OBSERVAÇÕES CLÍNICAS DOS ANIMAIS

Em relação ao estado de saúde dos animais dos 2 grupos não ocorreram ao longo do experimento alterações visuais quanto ao aspecto de urina, fezes e pêlos. Durante o período operatório 2 animais do grupo álcool vieram a morrer. Na região onde foi realizado o defeito ósseo não foi observado ulcerações ou complicações no processo de cicatrização. Os animais apresentaram rápida recuperação pós-cirúrgica, não comprometendo a deambulação dos animais por mais de 24 horas.

# 6 - RESULTADOS

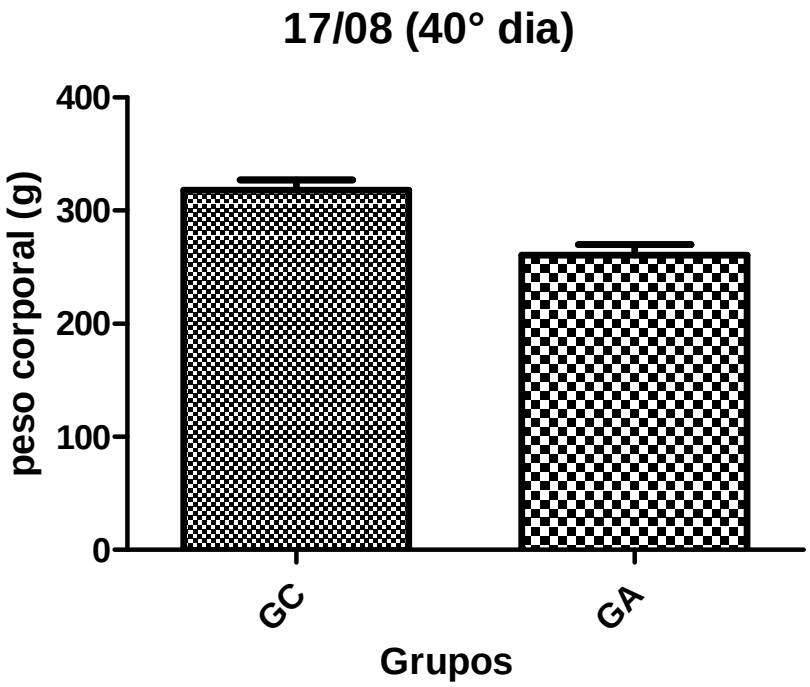
O grupo controle apresentou no início do experimento peso corporal de 181g, enquanto o grupo alcoólico 184g, resultados que não são estatisticamente significativos (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Demonstração do peso dos animais dos grupos controle e álcool no início do experimento.




No 40° dia de tratamento o peso corporal do grupo controle foi de 318g enquanto que o grupo alcoólico apresentou peso de 260g, o que torna o resultado estatisticamente significante (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Peso dos dois grupos de animais no quadragésimo dia de experimento. Podemos observar que o ganho de peso no grupo álcool foi menor.




No 50° dia de tratamento o peso corporal do grupo controle foi de 327g enquanto que o grupo alcoólico apresentou 274g, confirmando novamente a diferença estatística (Gráfico 3).

Ao final do tratamento, ou seja, no 100° dia (eutanásia) o peso corporal do grupo controle foi de 364g enquanto que o grupo alcoólico apresentou 308g, confirmando os mesmos resultados obtidos ao longo do experimento e que demonstram que os ratos submetidos à dieta líquida com solução alcoólica apresentaram ganho de peso menor do que os do grupo controle (Gráfico 4).

No gráfico 5 demonstramos a evolução do peso dos animais dos dois grupos durante o período de experimento.

Gráfico 3 – Peso dos dois grupos de animais no qüinquagésimo quinto dia de experimento. O grupo álcool continua com taxas de ganho de peso menores do que o grupo controle.

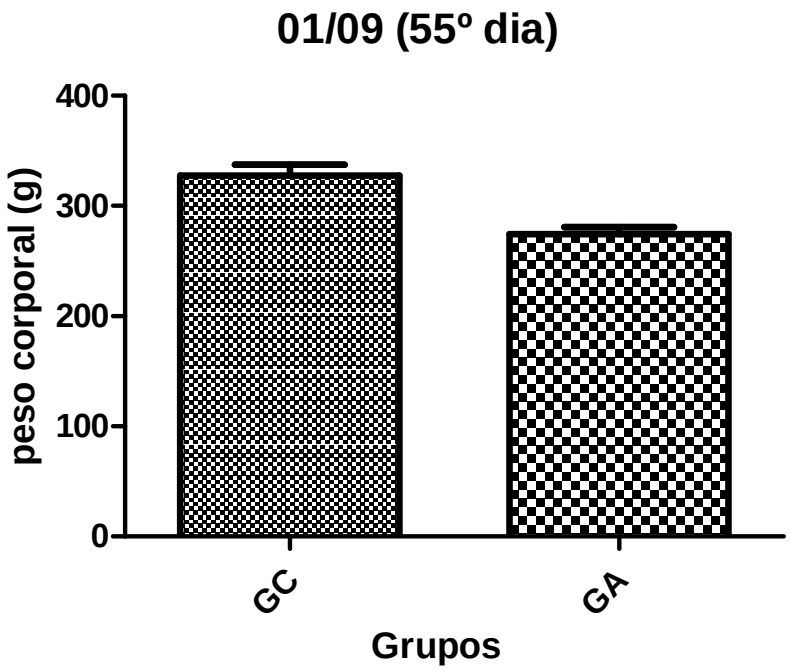



Gráfico 4 - Centésimo dia de experimento. Grupo controle continua apresentando ganho de peso acentuado em relação ao grupo álcool.

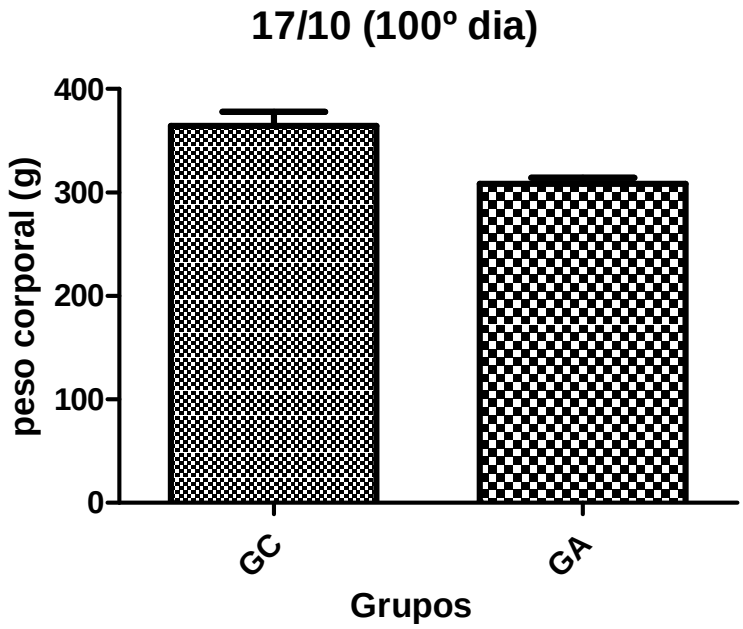
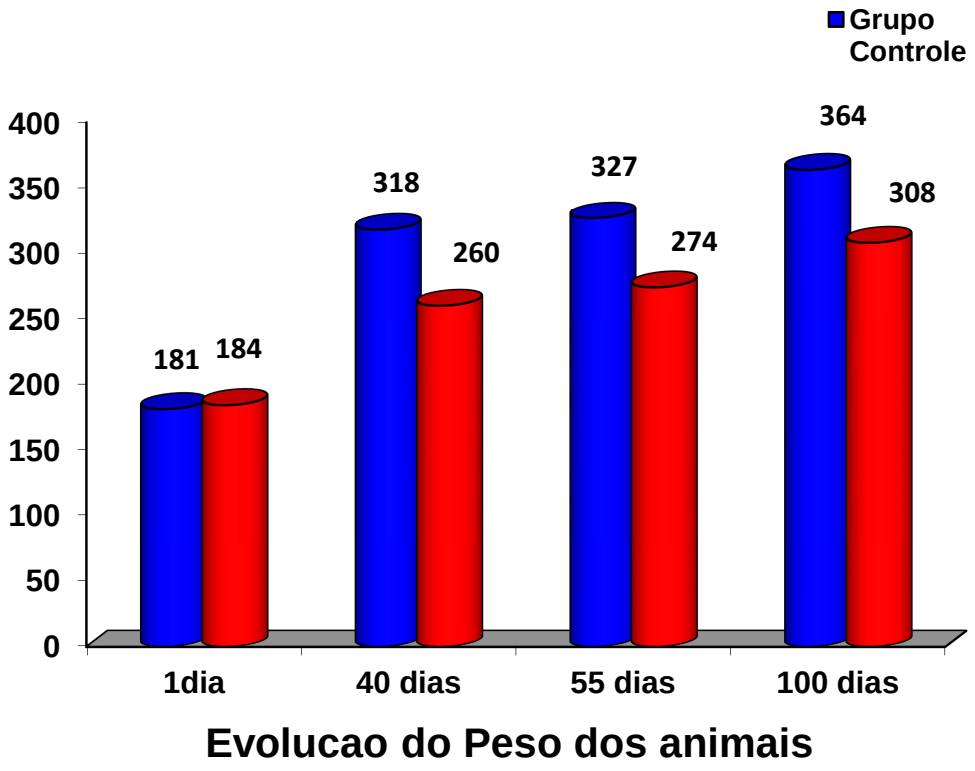


Gráfico 5 - Evolução do peso dos animais dos dois grupos desde o início do experimento até o centésimo dia, quando os animais foram eutanasiados.




## 6.2 – DENSIDADE ÓSSEA

A análise histométrica dos cortes demonstrou que existem diferenças significativas entre as densidades ósseas dos grupos sem defeito analisados.

As tíbias do grupo controle (SDC) apresentaram densidade óssea aproximadamente 144% maior do que as tíbias do grupo álcool (DAS) (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Dados, em porcentagem, da densidade óssea das tíbias sem defeito. A análise estatística demonstrou que a densidade óssea das tíbias do grupo controle é aproximadamente 144% maior do que densidade das tíbias do grupo álcool.

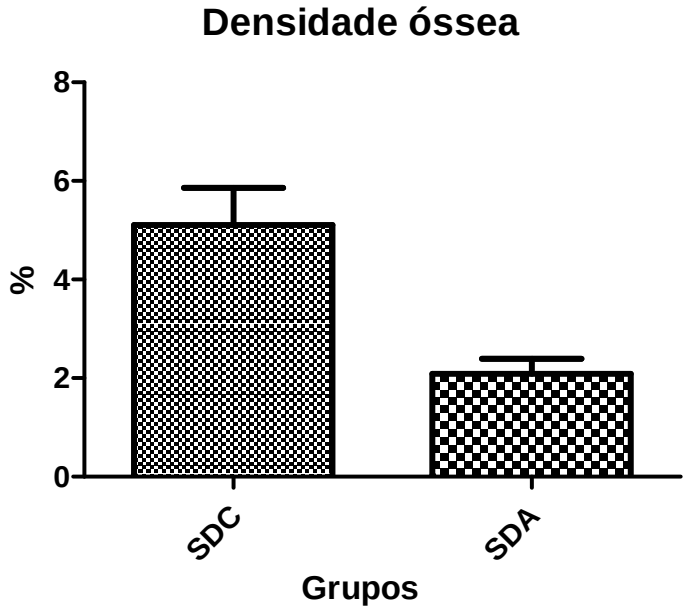
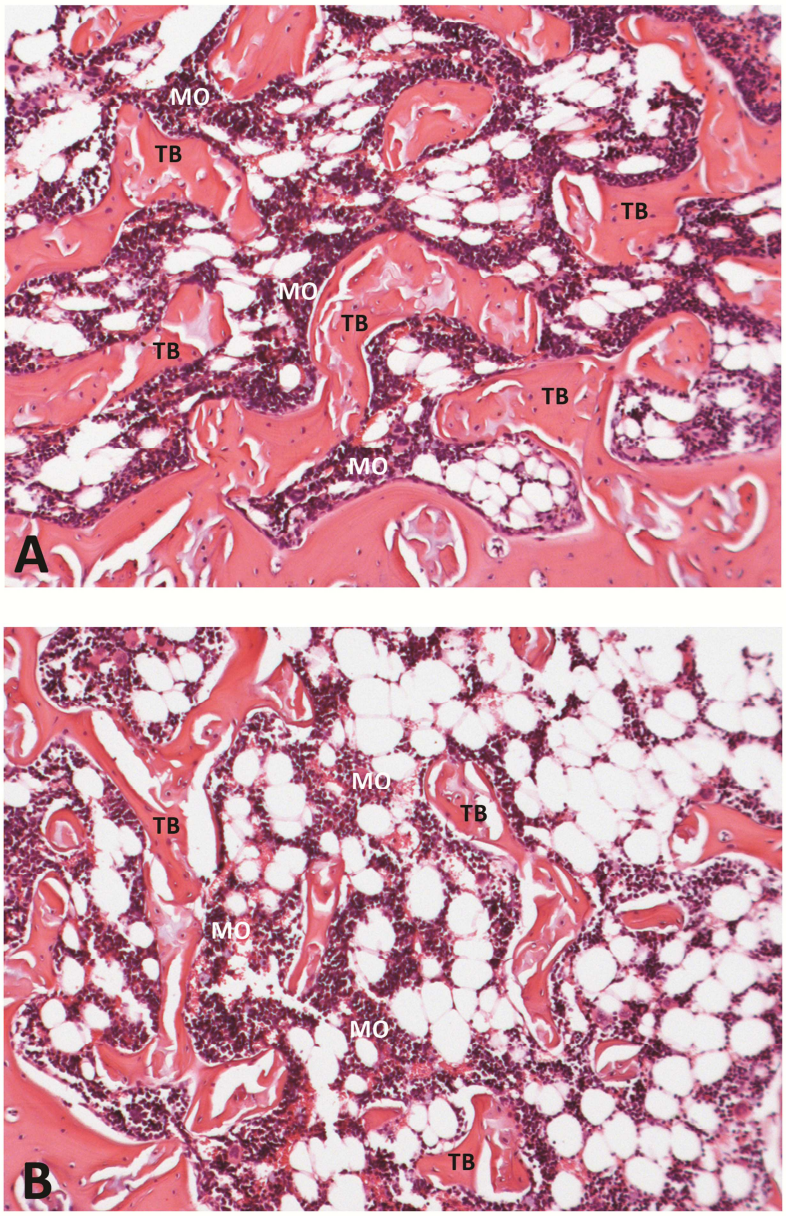


Figura 4 - Fotomicrografia das tíbias dos grupos sem defeito demonstrando as diferenças de densidade óssea entre o grupo controle (A) e grupo Álcool (B).




Legenda - TB, trabéculas ósseas; MO, medula óssea

## 6.3 - REMODELAÇÃO ÓSSEA

A análise estatística da área óssea neoformada expressas em mm², demonstrou que a área de osso neoformado no grupo controle é 34% maior do que a área de osso neoformado no grupo álcool (gráfico 7).

Na fotomicrografia das áreas analisadas é possível notar maior quantidade de tecido neoformado no grupo controle.

Gráfico 7 – Análise estatística das áreas ósseas neoformadas demonstrando remodelação óssea 34% maior no grupo controle.

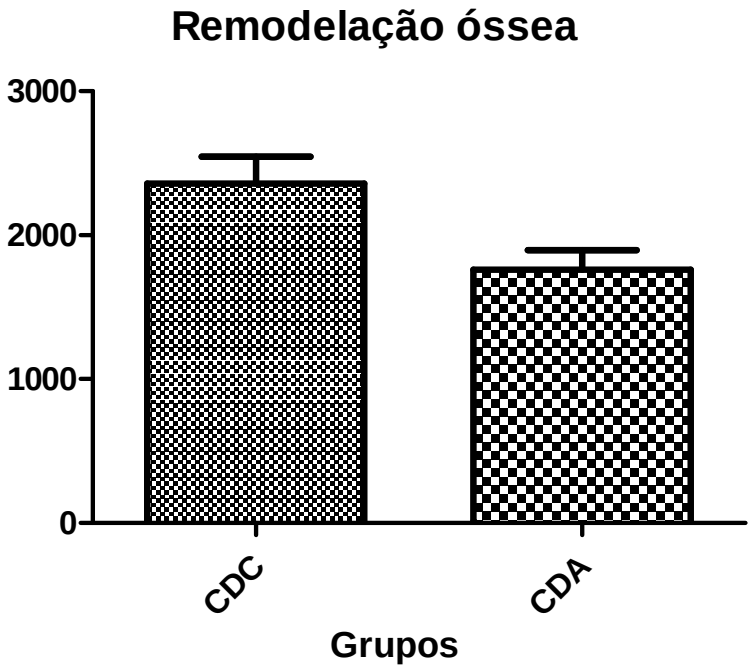
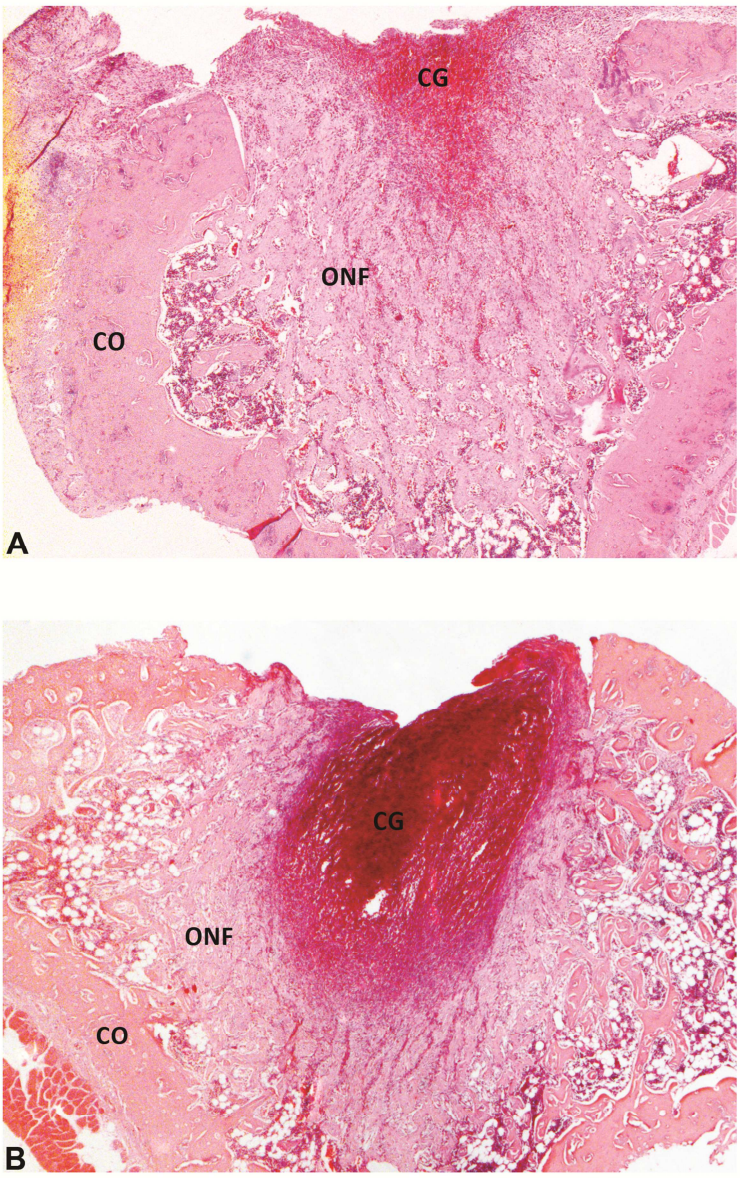


Figura 5 - Fotomicrografia demonstrando as diferenças entre o volume de remodelação óssea nos grupos controle e álcool.




Legendas - A, grupo controle; B, grupo álcool; CO, cortical óssea; ONF, osso neoformado; CG, coágulo sanguíneo.

## 6.4 – IMUNOHISTOQUÍMICA RANKL/OPG

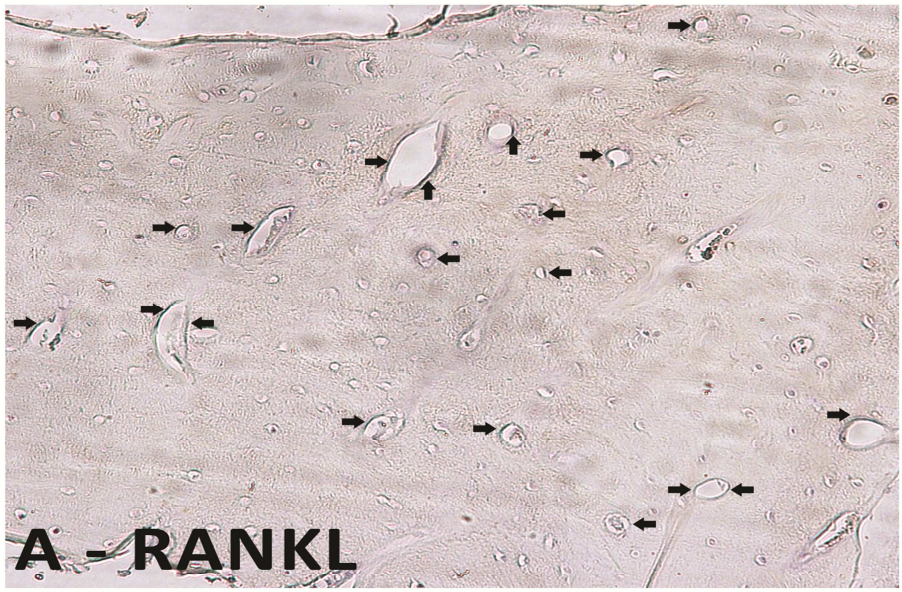
Nossos resultados demonstraram que no grupo álcool ocorreram menos marcações de OPG do que RANKL, evidenciando que a formação óssea é retardada se comparada ao grupo controle (Figura 6). Vereificamos, também, que a quantidade de marcações de RANKL e OPG no grupo controle foram similares e em maior quantidade (Figura 7).

## 6.5 - PRICO SIRIUS RED

Utilizando a técnica de Pricus Sirius Red pudemos verificar que o grupo sem defeito álcool apresentou fibras colágenas com padrão de birrefigência predominantemente esverdeado e poucas regiões com padrão de birrefigência amareladas, evidanciando imaturidade dessas fibras.

No grupo sem defeito controle a predominância é de fibras de birrefigências esverdeadas, porém com várias regiões com padrão de birrefigências amareladas e alaranjadas, demonstrando maior grau de maturidade de fibras colágenas (Figura 08).

Figura 6 - Imunohistoquímica demonstrando maior quantidade de marcações de RANKL (A) em relação às marcações OPG (B) no grupo álcool.



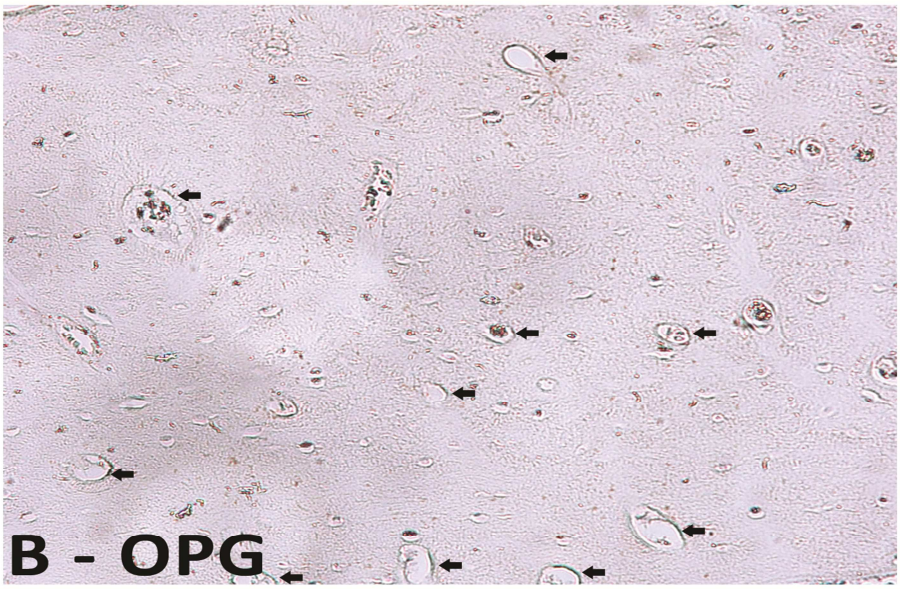



Figura 7 - Imunohistoquimica demonstrando quantidades equivalentes de RANKL (A) E OPG (B) no grupo controle.

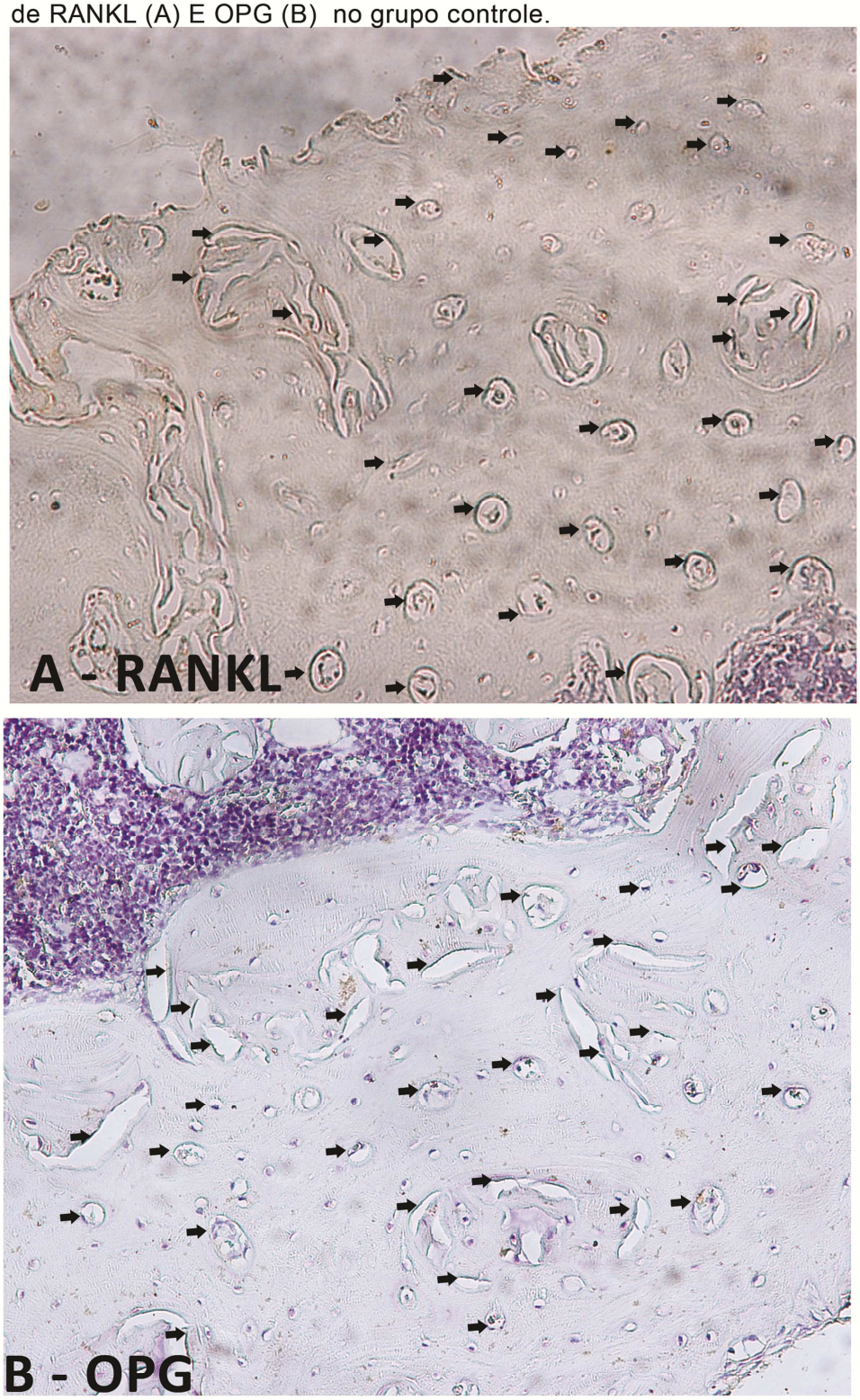
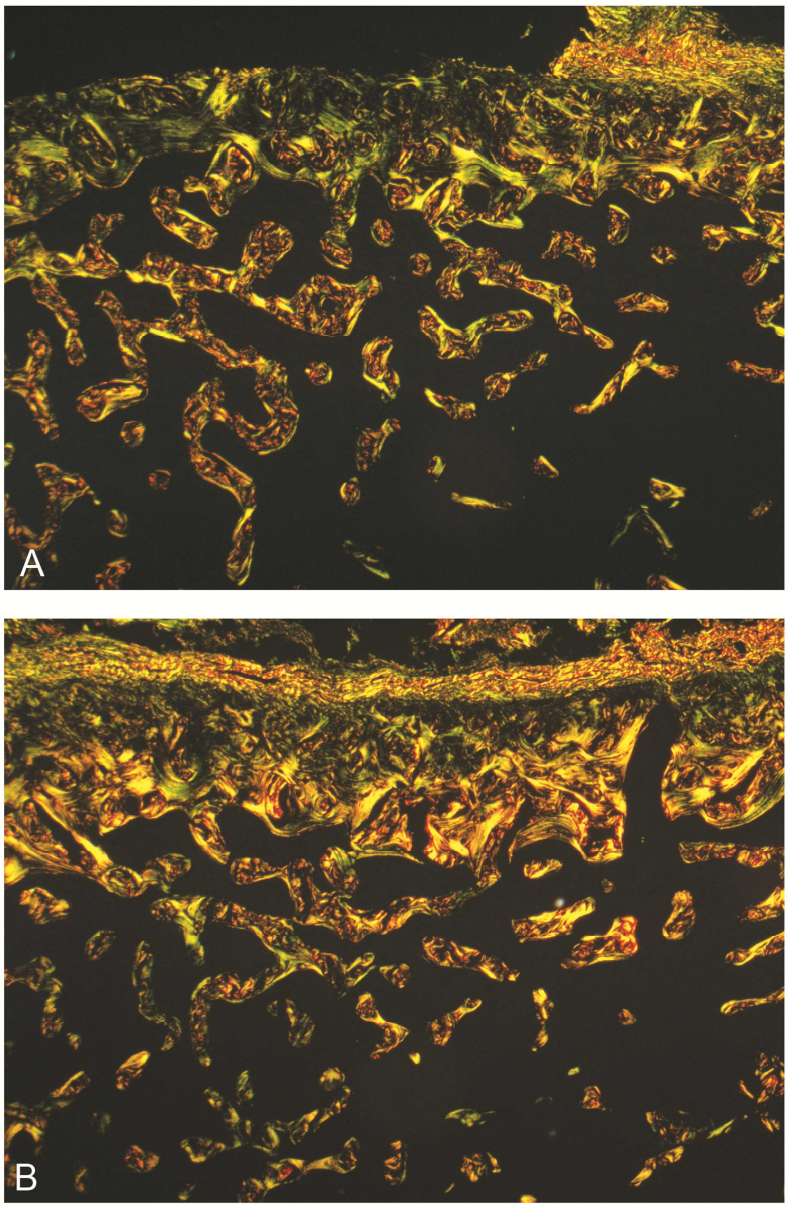


Figura 08 - Prico Sirius Red demonstrando no grupo álcool (A) predominância de fibras colágenas imaturas (birrefigência esverdeada. Prico Siris Red demonstrando no grupo controle (B) fibras colágenas maduras (birrefigência amareladas/alaranjadas).



# 7 - DISCUSSÃO

Diversos estudos têm demonstrado o efeito do álcool sobre o metabolismo, tanto de humanos como de ratos (PEREIRA, 2002; FAUSTINO, 2003; ANDREO, 2008; SANTORUM 2010) dentre outros.

Estudos utilizando ratos como modelo experimental mostraram que ratos que consomem o álcool cronicamente sofrem com diversos problemas metabólicos, dentre eles danos ao tecido ósseo e atraso no ganho de peso.

Variados protocolos que expõem animais a uma dieta alcoólica vem sendo utilizados para estudar os seus efeitos em vários tecidos.

Em nosso trabalho, os animais foram pesados em quatro momentos distintos, (1° dia, 40° dia, 55° e no dia do sacrifício, ou seja, no 100° dia). Os dados obtidos mostraram que os dois grupos (álcool e controle) tiveram um aumento de peso. Uma vez verificado que o peso dos animais do grupo álcool e controle fossem parecidos, a partir da segunda pesagem, houve significativa diferença em relação ao ganho de peso entre os dois grupos. O mesmo aconteceu na terceira e na quarta pesagem (dia do sacrifício).

Nossos resultados estão de acordo com os dados de Faustino (2003) que durante 20 semanas observou o peso corpóreo de dois grupos de ratos. Um dos grupos ingeriu álcool em uma concentração progressiva (máximo de 20º GL) e controlada, o outro grupo consumiu apenas água e ao final desse período houve uma considerável diferença de massa corpórea dos animais alcoolizados comparados aos não alcoólatras.

Nossos dados também coincidem com o trabalho de Buchaim (2009), que se preocupou em mensurar o peso dos animais em 11 momentos distintos no decorrer de 90 dias da pesquisa, em que ratos foram submetidos a uma dosagem alcoólica progressiva de álcool (máximo de 25°GL) e os resultados sinalizam que o álcool exerce efeito sobre o ganho de peso dos animais, concluindo que o ganho de peso foi inversamente proporcional à dosagem alcoólica.

Mais recentemente, Santorum (2010), após 120 dias de exposição ao álcool, (até concentração máxima 30°GL) comparou os pesos dos dois grupos de ratos, e observou que os animais do grupo álcool não tiveram ganho de peso corporal em relação aos controles. Além disso, foi feita a verificação do consumo de ração e os animais do grupo álcool consumiram em média 29,9% a menos de ração por semana do que os animais controle, possivelmente em virtude da aguardente de

cana apresentar alto valor calórico inibindo a necessidade de ingerir alimento. Embora não tenhamos verificado a quantidade de consumo de ração, nossos dados corroboram com os resultados de Santorum.

Por outro lado, nossos dados são diferentes dos dados mostrados por Souza (2007), que mensurou os efeitos de uma dieta líquida com concentração de álcool a 20 GLº, por um período de 8 semanas e não notou diferenças significativas comparando o peso dos animais alcoolizados com os animais do grupo controle que ingeriram apenas água.

É interessante notar que embora os nossos dados sejam parecidos com os dados de Faustino, Buchaim e Santorum, os protocolos usados nesses estudos diferem um do outro. Embora em todos estes trabalhos o protocolo adotado tenha sido o protocolo semi-voluntário, em que os animais têm livre acesso à comida e á água (com ou sem álcool), as concentrações alcoólicas e o tempo de exposição variaram em cada experimento.

Os resultados encontrados em nosso trabalho podem diferir, por exemplo, dos resultados encontrados por Souza (2006) porque talvez o tempo de exposição de 8 semanas e a concentração de álcool usadas por ele tenham sido insuficientes para causar alteração no peso corpóreo dos animais. Neste trabalho, ao 40º dia de experimento os ratos do grupo álcool não apresentaram diferença significativa de peso em relação ao grupo controle. Uma vez que nossos resultados demonstram que ao 40º dia houve significativa diferença de peso entre o grupo álcool e controle, podemos deduzir que a concentração de álcool usada em nossos experimentos tenha sido mais adequada para causar efeitos nos animais do que a concentração usada por ele.

Podemos então propor que, nesse caso, o nível de concentração de álcool foi mais importante que o tempo de exposição para que ele não encontrasse diferenças significantes no peso dos animais.

No entanto, os dados obtidos em nosso estudo relacionados ao peso dos animais estão bem próximos ao trabalho de Santorum (2010), fato que pode ser atribuído às semelhanças tanto entre o tempo de consumo e concentração alcoólica.

Sob o mesmo protocolo de indução ao alcoolismo, Oliveira (2004) verificou que houve diferença estatisticamente significante no ganho de peso no grupo

controle, o que também confirma que protocolos parecidos tendem a demonstrar resultados parecidos.

O protocolo usado nesse trabalho se mostrou eficiente para os experimentos realizados porque o tempo de exposição e a concentração alcoólica causaram alterações no metabolismo dos animais. Os resultados adquiridos evidenciaram o efeito do álcool sobre o ganho de peso dos animais.

Outros estudos (LIEBER et al., 1998; D'SOUZA e EL-GUINDY, 2010) realizaram experimentos em que a exposição ao álcool foi a única fonte de dieta liquida. Porém os próprios autores concluem que esse método não é tão eficaz pois fazem com que os ratos possivelmente sofram desidratação.

Outro protocolo utilizado é o de intoxicação crônica e intermitente por inalação de vapores de etanol. O'Dell et al.,2004 utilizaram este método em um trabalho que compara a eficácia deste método comparado ao semi-voluntário.

O principio é o de manter o etanol em concentrações constantes durante 14 horas por dia durante até 8 semanas para induzir a dependência física e comportamental através da exposição em uma caixa selada para que o etanol seja evaporado. Observamos, porém que a desvantagem desse método se relaciona com a dificuldade de se manter as devidas concentrações constantes.

Em humanos, para que a dependência alcoólica ocorra, é fundamental que haja vulnerabilidade e suscetibilidade à dependência, fomentadas por condições biológicas, psicológicas, sociais e ambientais. Todavia, a dependência física, e suas consequências, aparecem relativamente tarde, geralmente após 4 a 6 anos de consumo regular para o adolescente e após 6 a 8 anos para o adulto.

Uma observação interessante relatada por Faustino (2003) é que o período experimental de 20 semanas pode ser considerado longo ao levarmos em conta que o rato é uma espécie animal com uma vida média curta, justificando-se então que uma exposição de pouco mais de três meses pode ser suficiente para que o experimento seja aceito como crônico. Desta forma, nosso estudo está em conformidade com Faustino visto que nosso período de exposição está dentro dos padrões sugeridos por ele.

Mais estudos sistematizados, usando exatamente o mesmo protocolo e o mesmo modelo animal, são necessários para podermos afirmar uma possível consistência de dados em diferentes trabalhos.

Em relação às alterações que o álcool causa no metabolismo ósseo, vários autores têm às descrito. (SAVILLE, 1965; OPPENHEIM, 1977; KRISHNAMRA,1983; SCHUCKIT, 2009 e MAUREL, 2012).

Em 2004, Bombonato demonstrou que após a exposicão ao álcool (cachaça 51) em concentração de ate 30ºGL o alveolo dental de ratos, após extração, mostrou uma quantidade reduzida de trabeculado ósseo, sugerindo um atraso no processo de cicatrização alveolar causada pela ingestão do álcool.

Lima et al., (2011) analisaram os efeitos do etanol sobre a osteogênese ao redor de implantes de hidroxiapatita em fêmur. Os resultados desse estudo demonstraram que, tanto na concentração de 5ºGL, quanto na concentração de 15ºGL, houve retardo no reparo ósseo ao redor dos implantes.

Buchaim et al, (2004) avaliaram histologicamente os efeitos do álcool no reparo ósseo da tíbia de ratos Wistar. Os autores relataram que em todos os animais do grupo experimental houve retardo na cronologia no processo de reparo ósseo. Em estudo mais recente, Buchaim (2009) analisou os efeitos de 3 dietas alcoólicas na reparação óssea em tíbias de ratos Wistar. Foram utilizadas concentrações alcoólicas diferentes para cada grupo. A analise das tíbias demonstrou que as diferentes concentrações alcoólicas utilizadas na dieta influenciaram a neoformacao óssea de diferentes maneiras. O processo de reparação e neoformação óssea foi retardado de acordo com a concentração alcoólica.

Histomorfometricamente nossos dados demonstraram diferenças significativas relacionadas à densidade e reparo ósseo entre os grupos álcool e controle. Nossos resultados concordam com Lima et al., (2011), demonstrando que e remodelação óssea nos ratos do grupo álcool sofreu atraso. Esses resultados sugerem um possível efeito negativo do álcool não somente sobre o peso dos animais como também na remodelação óssea.

Uma observação importante a se fazer em relação ao nosso experimento é a questão da idade dos ratos. Nossos estudos, que utilizaram ratos jovens, se comparados a outros estudos que utilizaram ratos adultos, não demonstram resultados diferentes.

Em relação à densidade e remodelação óssea, nossos resultados demonstraram um menor trabeculado ósseo no grupo álcool assim como uma menor

capacidade de regeneração óssea. Nossos resultados estão de acordo com os resultados de outros estudos (FREDERICK et al., 1999; HOGAN et al, 1999).

É curioso notar que em alguns estudos em seres humanos alcoólatras não é notado diferenças significativas da densidade óssea (Reimers, 2011). Em contradição, Angus et al., (1998) e Tucker et al., (2009) sugerem que o uso moderado de álcool pode diminuir as taxas de fratura óssea e aumentar a densidade principalmente em mulheres pós-menopausa. Sommer (2006) sugere ainda, que o consumo moderado de álcool estimula o aumento dos níveis de estrógeno em mulheres pós-menopausa e, consequentemente, previne o desenvolvimento de osteoporose.

Os efeitos do álcool sobre o esqueleto humano ainda não são bem conhecidos devido a dificuldade de relacionar os efeitos do álcool aos 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 normal (Turner, 2000). Adicionalmente, a dificuldade de interpretação dos estudos em humanos se deve às amplas variações na idade, duração e padrão de abuso do álcool dentre outros fatores.

Os resultados imunohistoquímicos de nosso trabalho concordam com os resultados encontrados em outros estudos que associam o desequilíbrio do sistema RANK/RANKL/OPG à doenças ósseas (HOFBAUER et al., 1999; GOLDRING, 2000; EGHBALI et al., 2003).

Simonet et al. (1997) realizaram uma série de ensaios para compreenderem o papel da osteoprotegerina, e observaram que ratos que expressavam o excesso dessa glicoproteína desenvolviam osteopetrose, que se caracteriza pelo aumento da densidade óssea e diminuição da atividade osteoclástica. Esses ensaios deram suporte a descoberta de que a OPG é um potente inibidor indireto da atividade osteoclástica. Posteriormente, em 1998, Yasuda et al., identificaram que outras moléculas também estavam envolvidas nesse processo, sendo elas o RANK e seu ligante RANKL e descobriram que a partir da interação RANK/RANKL ocorria a formação e atividade dos osteoclastos e consequentemente , a reabsorção do tecido ósseo.

Nossos experimentos demonstraram que no grupo controle existe uma expressão maior de OPG e RANKL do que no grupo álcool, o que nos leva a crer que o sistema está em equilíbrio e que o processo de neoformação óssea está ocorrendo de maneira equilibrada.

Já no grupo álcool encontramos uma maior expressão de RANKL comparado a OPG, demonstrando uma maior atividade osteoclástica no grupo álcool e, consequentemente, maior reabsorção óssea.

A atividade de RANKL e OPG é dependente de uma série de outros fatores imuno-inflamatórios, que funcionam como uma rede em favor ou contra a destruição tecidual. Como existem poucas informações na literatura sobre o papel de RANKL e OPG nas doenças ósseas relacionadas ao alcoolismo, deve-se ter cautela na interpretação dos resultados esperados (SANTOS, 2009).

Por serem os principais componentes da matriz extracelular, realizamos a reação histoquímica através do método de Prico Sirius Red para verificar a qualidade das fibras colágenas. É sabido que as fibras colágenas desempenham um importante papel na manutenção e integridade estrutural de tecidos (RICH et al, 2005). Quando há desequilíbrio na estrutura tecidual, essas fibras podem apresentar variações (ZHANG et al, 2011).

As fibras colágenas são birrefringentes, de modo que, quando examinadas ao microscópio de polarização, aparecem brilhantes, apresentando uma intensa birrefringência (MONTES, 1996; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

Sabe-se que as fibras colágenas maduras do tipo I são espessas e apresentam um padrão de birrefringência que varia do amarelo ao vermelho intenso, ao passo que essas fibras ainda imaturas ou com alguma desorganização em sua forma e tamanho, são mais delgadas e possuem fraca birrefringência que surge em tons esverdeados (HIRSHBERG et al., 2007; RETOMASO et al., 2010).

Em nosso estudo pudemos observar resultados consistentes relacionados aos autores citados. Fibras colágenas imaturas puderam ser observadas de forma intensa no grupo álcool, demonstrando menor grau de desenvolvimento estrutural e possível atraso na neoformação óssea.

# 8 - CONCLUSÃO

Após a analise dos resultados e de acordo com os limites dos métodos empregados podemos concluir que:

- Através da morfometria foi demonstrado que em um protocolo de 100 dias de ingestão de álcool numa concentração progressiva e controlada, ocorre alteração negativa na densidade e consolidação ósseas;

- O ganho de peso corpóreo foi maior no grupo controle;

- A exposição proposta infere um estado de subnutrição no grupo experimental;

- Histologicamente o álcool retarda o desenvolvimento de fibas colágenas, levando ao atraso da formação óssea.

- Os achados imunohistoquimicos mostram em termos gerais que tanto o grupo controle quanto o grupo álcool revelam presença de OPG e RANKL. A presença das mesmas proteinas em diferentes níveis e quantidades é notável no grupo álcool, ressaltando com isso as adaptações do tecido ósseo frente à exposição do álcool.

# 9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANANDARAJAH, A.P. Role of Rankl in boné diseases. **Trens endocrinol metab**. V. 20 n 2 p 88-94 , 2009

ANDIA, D.C.; CERRI,L.C.; SPOLIDORIO,L.C.Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 35, n.2, p. 191-98, 2006.

ANDREO,J.C.; RODRIGUES, A.C.; SILVA,F.B.; JUNIOR,G.M.R.; MORAES,L.H.R.; SOUZA,M.G.S. Morphometric evaluation of submandibular land of rat (Rattus Novergicus) submited to the alcohol diet – Part II. **Cienc Odontol Bras**, v.11, n .1, p. 42-48, 2008

ANGUS, R. M.; SAMBROOK, P. N.; POCOCK, N. A. Dietary intake and bone mineral density. **Bone Miner**, v. 4, p. 265–277, 1998.

ARISAWA, E.A.L.; ROCHA, R.F.; CARAVALHO, Y.R.; MORAES, E; ALMEIDA, J.D. Influência da calcitonina na reparação óssea de tíbias de ratas ovariectomizadas. **Rev Fac Odontol São José dos Campos**. v. 3, p.49-53, 2000.

ARNOW,B.A. Relationships between childhood maltreatment, adult health and psychiatric outomes, and medical utilization**. Journal Clinical Psychiatry**, v.65 n.3,p. 10-15.2004

BARROS,D.R.; CARVALHO, E. A. B.; ALMEIDA, M. R.: RODRIGUES, C. A. Alcoolismo no contexto organizacional: uma revisão Bibliográfica. **Psicologia &m foco**, Aracaju, Faculdade Pio Décimo, v. 2, n. 1, 2009.

BEZERRA,M.C.; CARVALHO, J.F.; Rank and Rankl and Osteoprotegerin in arthritic bone loss. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 38, p 161-170, 2005.

BÍBLIA SAGRADA. Edição Pastoral – Paullus. Gênesis 9:20-21, 1990

BOMBONATO,P.; FITTIPALDI,K.; BRENTEGANI,L. G. ; THOMAZINI,J.A.; LACHAT,J.J.; CARAVLHO, T. L. L. Alcohol Intake and Osseointegration Around Implants: A Histometric and scanning electron microscopy study. **Implant dent** . v.13, n.3, p.238-44, 2004.

BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY,D.L . Osteoclast Differentiation and activation. **Nature**, v. 423, p. 337-42, 2003.

BUCHAIM,R.L.; BUCHAIM,D.V.; ANDREO,J.C.; ROQUE,D.D.; ROQUE,J.S.;RODRIGUES,A.C. Effects of three alcoholic diets on the bone repair in the tibia of rats. **Ciênc. odontol. bras**. v12 ,n.2, p.17-23, 2009.

BUCHAIM,R.L.;BUCHAIM,D.V.;USTULIN,D.R.;ROQUE,D.D;ANDREO,J.C;ROQUE.J .S.Histological evaluation of the alcohol effects in the rats tibia bony repair **Arqu. Ciênc Saúde.** v.11, n.3, p.142-145, 2004.

BUSER, D.; DHANLIN, C.; SCHENK, R.K. Regeneração óssea guiada na implantodontia. São Paulo: Livraria Santos Editora Comp. Imp. Ltda., 1996

CAGNON,V.H.A. Ultrastructural study of the coagulanting gland of wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingention. **Prostate New York** v. 28, p. 341-346, 1996.

CALLACI, J.J.; HIMES, R.; LAUING, K.; WEZEMAN, F.H.; BROWNSON, K. Bingalcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone**. Calcif Tissue** Int ,v. 84, p.474–48, 2009.

CLONINGER, C,R. Asystematic method for clinical description anclassification of presonality variations**. A proposd. Arch Gen Psych,** v.44, n.6, p.573-88,1987.

Companhia Muller de Bebidas, Página do Estudante, 2012. Disponível em: <http://www.ciamuller.com.br/estudantes.php>. Acesso em 4 agosto 2012

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS : Bases patológicas das doenças- Patologia. Sétima edição. Editora Guanabara Koogan, 2008

CROTTI,T.; SMITH,MD. Receptor activator NFKB ligand (Rankl) and OPG protein expression in periodontitis **J. Period Res,** v. 38, p. 308-7, 2003.

D'SOUZA, E.G.N.B.; KOVACS, E.J, D'WITTE.P.; SPIES, C.; LITTLETON, J.M.; VILLIERS, W.J.; LOTT, A.J, PLACKETTl, T.P.; LANZKE, N, MEADOWS, G.G. Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model. **Alcohol Clin Exp Res** , v.34, p.1489–1511, 2010.

DIEZ, A.; SERRANO, S.; CUCURULL, J.; MARINOSO, L; BOSCH, J.; PUIG, J.; NOGUÉS, X.; AUBIA, J. Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-Dawley Rats. **Calcif Tissue Int.** v.61 n.5, p.168-71, 1997.

FAUSTINO,S.E.S.; STIPP,A.C.M. Efeitos do alcoolismo crônico e da desintoxicação alcoólica sobre a glândula submandibular de ratos. Estudo morfométrico. **J. Appl. Oral Sci.**, v. 11,n.1,p. 26-9, 2003

FELSON, D.T.; ZHANG, Y.; HANNAN, M.T.; KIEL, D.K. Alcohol consumption and bone mineral density in elderly women. **American Journal of epidemiology**, v.142, n.5, p. 485-492, 1995.

FROST, H.M. - A new direction for osteoporosis research: a review and proposal. **Bone**, v.12, p.429-437,1991.

FROST, H.M. - Bone Biodynamics. Ed. Boston. Little Brown, p.315-333, 1964.

GALLANGHER, J.C . Adavances in Bone Biolo and new treatments for bone loss. **Maturitas**, v. 60, p. 65-9, 2008.

GIGLIOTTI, A.; BESSA, M.A. Síndrome de dependência do álcool: critérios diagnósticos. **Rev Bras Psiquiatr.** V.26, nl p.3 , 2004.

GRCEVIC,D.;KATAVIC.D.; LUKIC,V.; KOVACIC,I.K. A Cellular and molecular interactions between Immune system and bone. **Croatian Medical Journal**, v. 42, n. 4 p. 384-392. 2001.

*GUYTON*, ARTHUR C.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006

HECMANN, W.; SILVEIRA, C.M.; Dependência do álcool: aspectos clínicos e diagnósticos. Álcool e suas consequências: uma abordagem multiconceitual. Barueri (SP): Minha Editora; p. 67-87.2009

HILL,P.A.; ORTH,M. - Bone remodelling **Brit J.Orth,** v. 25, n.2, p101-107, 1998.

HIRSHBERG, A.;KOSLOVISKY,L.M.; Koslovisky ,M; KAPLAN,A. The influence of inflammation on the polarization colors of collagen fibers in the wall of odontogenic keratocyst. **Oral oncology**, v.43, n.3, p. 278-282, 2007.

HOGAN, H.A.; SAMPSON, H.W.; CASHIER, E.; LEDOUX, N. Alcohol consumption by young actively growing rats. A study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. **Alcohol Clin Exp Rcs** v.21, p.809-816, 1997.

HUANG, L.; XU, JK.; WOOD,D.J. Gene expression of osteoprotegerin ligand, osteoprotegerina and receptor active tor of Kappa B in giant cell tumor of bone. **Am J Pathol**, v.156, p 761-7, 2000.

IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde do Escolar 2009. Disponível em : □http://WWW.ibge.gov.br/home/estatística/população/pense/default.shtm. acesso em 19 de agosto 2012.

JANICKE,L.; LORENS,J.R. Alcoholism and fracture healing. A radiological study in the rat. **Arch Orthop Trauma Surg**. v. 103, p.286–289. 1984

JUDAS,F.; PALMA,P.; FALACHO,R.I.; FIGUEIREDO,H. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. **TEXTO DE APOIO PARA OS ALUNOS DO MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA**. p.2-49, 2012

JUNG, M.K.; CALACCI, J.J.; LAUING,K.L.; OTIS,J.S. Alcohol exposure and mechanisms of tissue injury and repair. **Alcohol Clin Exp Res**. v.35, n.3, p.392-399, 2011

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2006

KLEIN, R.F.; FAUSTI, K.A.; CARLOS A.S. Ethanol inhibits human osteoblastic cell proliferation. **Alcohol Clin Exp Res**. v.20, n.3, p.:572-8.1996

KOSLA, S.; MINIREVIEW. The OPG/RANKL/RANK System. **Endocrinology**, v. 142, p. 5050-55 ,2001.

KRISTENSSON,H.; LUNDEN, A.; NILSSON, B.E. Fracture incidence and diagnostic roentgen in alcoholics. **Acta Orthop Scand**. v. 51, p. 205–207. 1980.

LARANJEIRA,R.;PINSKY,I.; ZALESKI, M, CAETANO, R. I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira. Brasília: **Secretaria Nacional Antidrogas**; 2007.

LEVY, R.S.; HEBERT, C.K.; MUNN, B.G.; BARRAC, R.L. Drug and alcohol use in orthopedic trauma patients: aprospective study. **J Orthop Trauma**. v. 10, p.21–27. 1996

LIEBER, C.S.; CARLI, L.M.; SORRELL,M.F. Experimental methods of ethanol administration.**Hepatology** v.10, p.501–510,1989.

LIEBER, C.S.; Jones, D.P.; Decarli, L.M. Effects of prolonged ethanol intake: Production of fatty liver despite adequate diets. **J Clin Invest**. v. 4, n.6, p.1009-21.1965

LIMA,C.C.; SILVA, T.D.; SANTOS,L.; NAKANAKI,W.R.; LOYOLA,Y.C.S.; RESCK,M.C.C.;CAMILLI,J.A.; SOARES,E.A.; GARCIA,J.A.D. Effects of ethanol on the osteogenesis around porous hydroxyapatite implants. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, n.1, 2011

LODI, K.B.; SILVA, J.R; CARVALHO, C.S.; ROCHA, R.F.; SANTO, A.M.E. Characterization of mineral contents on androgen deficient and chronic ethanol consuming rats by biochemistry and non-destructive techniques. **Papers Contributing to the 9th International Congress of Andrology**. Medimond In Barcelona, Spain. Bologna: Monduzzi Editore. p. 89-94, 2009

MARQUES, A.C.P.R. O uso do álcool e a evolução do conceito de dependência de álcool e outras drogas e tratamento. **Rev IMESC.** v.3, n., p.73-86, 2001.

MARTINEZ, F.E. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. **Prostate, New York**, v. 2, p. 317-324, 1993

MARTINI, F.H. Fundamentals of anatomy and physiology. New Jersey: **Prentice Hall**. v.4, p. 123-28, 1998.

MAUREL, D. B.; BOISSEAU, N.; BENHAMOU, C. L.; JAFFRE, C. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. **Osteoporosis International.** v. 23, n.1, p. 1-16, 2012.

Ministério da Saúde. Dimensão tática: Programas temáticos. Disponível em □http://WWW.planejamento.gov.br/secretarias/upload/Arquivos/spi/PPA/2012/mp_004_dimensao_tatico_sociais.pdf□. acesso em 27 de setembro 2012.

MOE, S.M. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. **Prim Care**. v.35, n .2, p.215, 2008.

MONTES, G. Structural Biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. **Cell Biology International**. v.20, n.1, p. 15-27,1996.

MORAES,E.; CAMPOS,G.M.; FIGLIE, N.B.; LARANJEIRA, R.R.; FERRAZ, M.B. Conceitos introdutórios de economia da saúde e o impacto social do abuso de álcool. **Rev Bras Psiquiatr**. V.28, n.4, p.:321-5, 2006.

NATIONAL INSTITUTE OF ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM. Understanding the impact of alcohol on human health and well-being. Disponível em □http://www.niaaa.nih.gov□. acessado em: 20 de agosto 2012.

O'DELL, L.E.; ROBERTS, A.J.; SMITH,R.T.; KOOB, G.F. Enhanced alcohol self administration after intermittent versus continuous alcohol vapor exposure. **Alcohol Clin Exp Res** v.28, p.1676–1682, 2004.

OLIVEIRA,R.L.; Effect of chronic alcoholics in ureter structure of rats (rattus novergicus). Dissertação de mestrado. **Instituto de ciências biomedicas da Universidade de São Paulo**. 2004

OPPENHEIM,W. The battered alcoholic syndrome. **J. Trauma.** v.17, p.850–6, 1977.

PEREIRA,K.F.; CONEGERO,C.I. Interface musculotendinea de ratos induzidos a ingestãoo alcoólica. **Acta Sci Biol Sci Maringá.** V. 26, n.3, p. 361-364, 2004.

PEREIRA,M.A.S.; ORSI,A.M.; MOLINARI,S.L.; GARCIA,P.J. Alcohol effects on the principal and clear cells of the caput epididymis of albino rats. **Anat. Hist. Embryol, New York.** v. 31, p. 1-4, 2002.

RICH,L; WHITTAKER,P.Collagen and pricosirius red atining: a polarized light assessment. **Of fibrillar hue and spatial distribution.** v.4, p.298-304, 2009

REIMERS,E.G.; NEGRIN,J.A.; FERNANDES,F.S.; GONZALES, M.C.M.; BETANCOR,I.H.; RODRIGUEZ,C.M.F.; RODRIGUEZ,F.; DIAZ,A.G. Vitamin D and Nutritional Status are Related to Bone Fractures in Alcoholics. **Alcohol and alcoholism.** v.46, n.2, p, 148-155, 2011

RETAMOSO, L.B.; MONTAGNER, F. ; CAMARGO, E.S.; VITRAL, R.W.F.; TANAKA, O.M. Polarized Light Microscopic Analysis of Bone Formation After Inhibition of Cyclooxygenase 1 and 2. **Anat Rec** v.293, n.2, p.195-9, 2010.

RICH,L; WHITTAKER,P.Collagen and pricosirius red atining: a polarized light assessment. **Of fibrillar hue and spatial distribution.** v.4, p.298-304, 2009

ROBBINS,S.L.; KUMAR,V.; ABBAS,A.K.; FAUSTO,N. **Patologia: Bases patológicas das doenças**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005

SANTORUM,M.; BAGGIO,M.P.D.; ORIENTE,A.; MELLO,S.A.; BIANCHI,F.J.; OLIVEIRA,R.L. Morphometric analysis of gastric neurons of the greater curvature glandular of rats induced to alcoholism. **Revista Paraense de medicina**. v.24, n.2 , p.7-11, 2010

SANTOS, V.R. Ligante do receptor do ativador do fator nuclear kβ e osteoprotegerina nas diferentes condições clínicas peri-implantares antes e após terapia mecânica anti-infecciosa [Dissertação de Mestrado]. Guarulhos. Universidade Guarulhos. 2009.

SAVILLE, P.D. Changes in bone mass with age and alcoholism. **J Bone Joint Surg**, v. 47, p.492- 499, 1965.

SAVOLA, O.; NIEMELA, O.; HILLBOMill,M. Alcohol intake and the pattern of trauma in young adults and working aged people admitted after trauma. **Alcohol**. v. 40, p. 269–73, 2005.

SCHENK, R.K. ; BROWER, B.D.; JUPITER, J.B.; LEVINE, A.M, TRAFTON P.G Skeletal trauma. **Philadelphia: Saunders**,. v. 2, p. 166, 1992.

SCHUCKIT, M.A. Alcohol-use disorders. **Lancet.** v. 373, p.492–501, 2009.

SHAPIR, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. **European Cells and Materials**. v.15, p. 53-76, 2008.

SILVA, C.M.O.M. Avaliação da ação do alendronato sódico sobre a reparação óssea na ausência dos hormônios ovarianos. [Dissertação de Mestrado]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2000.

SILVA,G.L.; FONSECA,A.G.; SANTOS,H.K.A.S.; SERTÃO,M.A.L.Publicação Científica do Curso de Bacharelado em Enfermagem . **CEUT**. Edição 44 , 2011

SILVA, R.F. Efeitos das isoflavonas da soja associadas ä vibração mecânica de baixa intensidade no tecido ósseo de ratas osteopênicas. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2011.

SOARES,E.; FAVARO, W.J.; CAGNON, V.H.; BERTRAN, C.A, CAMILLI, J.A.Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**,v..28, n.1, p.101-107, 2010.

SODEK,J.; McKEE, M.D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontol**. v. 24, p.99-126, 2000.

SOMMER,I.; ERKKILA, A.T.; JARVINEN, R.; MURSU; SIROLA, J.; JURVELIN, J.S.; KROGER, H.; TUPPURAIN, M .**Public Health Nutr**. v. 17, p.1-9, 2012.

SOMMERFELD, D.W.; RUBIN, C.T. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. **Eur Spine J**. v.10, p.86–95,2001.

SOUZA, D.M.;ROCHA,D.;KANTORSKI,K.Z.; ROCHA,R.F.Influence of the chronic consumption of ethyl alcohol in the morphology of long bone in young adult female rats. **Cienc Odontol Bras**. v.10, n.1, p.19-25, 2007.

SOUZA,D.P.O.; SILVEIRA,F. D. X. Recente use of alcohol, tobacco, and other drugs among working and nonworking adolescents – **rev bras epidem** v.10, n. 2, p. 276-287 , 2007.

SOUZA,E.G.; KOVACS, E.J.; Witte,D. P.; SPIES, C; LITTLETON, J.M; VILLIERS, W.J.; LOTT, A.J.; PLACKETT, T.P.; LANZKE, N.; MEADOWS, G.G. Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model. **Alcohol Clin Exp Res** v. 34, p.1489–1511 ,2010.

TAY, J.Y.Y.; BAY, B.H.; YEO, J.F.; HARRIS,M. Markers for macrophage and osteoclast lineages in giant cells lesions of the oral cavity. **J. oral maxillofac surg,** v. 55, p. 1108-1112, 1997.

TUCKER,K.L.; JUGDAOHSINGH, R.; POWELL, J.J. Effects of beer, wine, and liquor intakes on bone mineral density in older men and women. **Am J Clin Nutr** . v.89, p.1188–1196, 2009.

TURNER,R.T. Skeletal response to alcohol. **Alcohol Clin Exp Res** 2000 v. 24, n. 11, p. 1693 – 1701,2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO GLOBAL STATUS REPORT ON ALCOHOL 2004- DEPARTMENT OF MENTAL HEALTH AND SUBSTANCE ABUSE – GENEVA. DISPONÍVEL EM: □HTTP://WWW.WHO.INT/SUBSTANCE_ABUSE/PUBLICATIONS/GLOBAL_STATUS_REPORT_2004_OVERVIEW.PDF□. ACESSO EM 04 AGOSTO 2012

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The world health report 2007 - A safer future: global public health security in the 21st century, 2007. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2007/whr07_en.pdf>. Acesso em 04 agosto 2012.

ZHANG,J.Y.; DONG,Q.;LI,T.J. Differences in collagen fibres in the capsule walls of parakeratinized and orthokeratinized odontogenic cysts. **Int. J. Oral Maxillofac**. Surg v. 40, p. 1296–1300, 2011.

WOLFGANG,H.; SILVEIRA, C. M; Dependência do álcool:aspectos clínicos e diagnósticos. Brasil. Ministério da Saúde. 2010. Disponível em: < http://orig.cisa.org.br/UserFiles/File/alcoolesuasconsequencias-pt-cap3.pdf>. Acessado em 14 fevereiro 2012.

YASUDA, H.; SHIMA,N.; NAKAGAWA,N. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proc Natl Acad Sci**, v. 95, p. 3597-3602, 1998.