

Avaliação histológica dos efeitos do álcool no reparo ósseo da tíbia de ratos

Histological evaluation of the alcohol effects in the rats tibia bony repair

Rogério L. Buchaim¹, Daniela V. Buchaim², Deise R. Ustulin³, Domingos D. Roque⁴, Jesus C. Andreo⁵, José S. Roque⁶

¹ Doutor em Ciências da Saúde – FAMERP, Professor de Anatomia Humana da Faculdade de Odontologia de Araçatuba e da Universidade de Marília, ² Mestranda em Biologia Oral – Universidade do Sagrado Coração – Bauru, ³ Acadêmica de Biomedicina da Universidade de Marília, ⁴ Professor Mestre da Disciplina de Anatomia Humana da Universidade de Marília, ⁵ Professor Livre Docente da disciplina de Anatomia Humana da Universidade de São Paulo – Bauru, ⁶ Professor Mestre da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial da Universidade de Marília

Resumo Foram utilizados 30 animais (*Rattus norvegicus*) com o objetivo de avaliar histologicamente a neoformação óssea com a utilização de um modelo de alcoolismo crônico experimental em tíbia de ratos. Os animais foram separados em 2 grupos: Controle e Experimental. Os animais do Grupo Controle bebiam apenas água de dieta líquida e os do Grupo Experimental bebiam álcool etílico diluído a 6%. Após 60 dias de tratamento, os animais dos dois grupos foram submetidos à cirurgia experimental na qual a tíbia recebeu uma perfuração de dois milímetros de diâmetro. Os animais foram sacrificados com 10, 20 e 40 dias após a cirurgia. Nas lâminas pode-se observar que nos três períodos a neoformação óssea foi menor em todos os espécimes do Grupo Experimental, quando comparados aos Controles. Ocorreu um retardo no preenchimento ósseo da loja cirúrgica, incompleto até os 40 dias de reparação, nos animais do Grupo Experimental. No Grupo Controle a cavidade cirúrgica estava completamente preenchida de tecido ósseo neoformado. Esses resultados permitem concluir que a dieta alcoólica interfere na reparação óssea, retardando a neoformação.

Palavras-chave Regeneração Óssea, Transtornos Induzidos por Álcool, Técnicas Histológicas.

Abstract For the study, 30 animals (*Rattus norvegicus*) were used with the histological purpose of evaluating bony neoformation using an experimental model of chronic alcoholism in the rats' tibia. The animals were separated in 2 groups: the experimental group and the control group. The animals of control group had a liquid water diet, and the experimental group had an intake of ethylic alcohol at 6%. After a 60 day-treatment, the animals of both groups were submitted to an experimental surgery, where the tibia received a two-millimeter diameter perforation. The animals were sacrificed on the 10th, 20th and 40th day after the surgery. On the slides, it can be observed, that in three periods the bony neoformation was lower in every specimen in the experimental group, when compared with the control group. A delayed in fulfilling bony surgical cavity had occurred because it was not completed until 40 days of repairing in animals of the experimental group. In the Control Group the surgical cavity was completely filled with neoformed bone tissue. These results lead to a conclusion that the alcoholic diet intervenes with the bony restitution delaying the neoformation.

Keywords Bony Regeneration, Disturbance-induced by Alcohol, Histological Techniques

Introdução

Estimativas norte-americanas revelam que sete por cento da sua população consomem álcool, o que não representa o número real de alcoólatras existentes, pois muitos indivíduos omitem o uso desta droga¹. O uso prolongado de álcool causa multiplicidade de anormalidades clínicas, bioquímicas e eletrofisiológicas, que estão associadas com doenças do fígado, sistema neuromuscular, coração e cérebro².

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 homens relativamente jovens à meia-idade, mais provavelmente osteoporose³⁻⁶. Diversos sintomas podem indicar doenças ósseas devido ao alcoolismo crônico. Entretanto, isso parece não ter despertado interesse em pesquisadores, provavelmente devido à presença de outras complicações sérias do alcoolismo crônico e agudo².

No Brasil, a osteoporose atinge 10 milhões de pessoas, sendo que três em cada quatro diagnósticos são realizados so-

mente depois da primeira fratura, que levam a 80.000 fraturas de quadril por ano, com 15.000 óbitos. As mulheres são quatro vezes mais susceptíveis que o homem e, depois da menopausa, uma em cada três mulheres está condenada a ter a doença. Como a osteoporose não tem cura, a prevenção é essencial através de cuidados, como, por exemplo, evitar o uso abusivo de álcool⁷. Com mais de 20 anos de atuação, a Associação Brasileira para o Estudo do Álcool e outras Drogas (ABEAD) contribui com propostas de prevenção, políticas de tratamento e ajuda assistencial aos dependentes do álcool e do fumo⁸.

Embora o alcoolismo tenha sido um dos maiores problemas médicos e sociais de quase todas as sociedades do século passado, a apreciação de que o abuso do álcool possa levar a doenças ósseas é atual⁹. O uso abusivo do álcool traz alterações em vários tecidos corporais, devido a sua ampla distribuição. No tecido ósseo, comparativamente com outros, a concentração de álcool é baixa, mas as alterações ocorrem de acordo com o tempo do uso da droga¹.

Ratos com dietas líquidas contendo álcool apresentaram, histologicamente, reparação de fraturas mais demorada, associada com diminuição da densidade e conteúdo mineral ósseo¹⁰. Sendo assim, este estudo propõe-se a avaliar histologicamente os efeitos da dieta alcoólica na reparação óssea.

Material e método

Foram empregados 30 ratos (*Rattus norvegicus, albinus, Wistar*), machos, com peso entre 200-240 gramas. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas Animais da Universidade de Marília. Os animais foram separados em: 1) Grupo Controle (C), que recebeu água de torneira como dieta líquida, 2) Grupo Experimental (E), que recebeu álcool etílico diluído em água de torneira a 6%. Os animais foram alimentados antes e durante o período experimental com ração sólida. O grupo experimental foi submetido a adaptação gradativa ao álcool, recebendo dieta líquida de álcool etílico diluído a 2% na primeira semana, 4% na segunda semana e 6% na terceira semana. Após esse período, esses animais continuaram a receber dieta alcoólica a 6% por um período de 60 dias. Após o término do período de tratamento, todos os animais (grupos controle e experimental), foram submetidos à cirurgia experimental.

Para as intervenções cirúrgicas, os ratos foram anestesiados aplicando-se injeção intramuscular de Ketamina 50 (75 mg/kg) + Rompum (1,5 ml/kg), seguido de tricotomia e antisepsia da

área. Na região ventral da pata esquerda do animal realizou-se a incisão com lâmina de bisturi número 15 no sentido longitudinal da tíbia com 20 mm de extensão. Em seguida, a divulsão foi executada com instrumento de ponta romba e o periósteo foi incisado e rebatido. Uma perfuração foi realizada no osso, com broca esférica número 6 em baixa rotação, irrigada a solução de cloreto de sódio a 0,9%. Lavou-se a cavidade com a mesma solução para remoção de espículas ósseas, ficando a cavidade preenchida somente de coágulo.

Os tecidos foram reposicionados e a sutura realizada com fio de seda 4.0.

Cinco animais de cada grupo foram sacrificados após 10, 20 e 40 dias pós-operatórios. A tíbia esquerda foi separada das demais estruturas anatômicas e fixada em formol 10% durante 24 horas, e, em seguida, descalcificada em solução de citrato de sódio e ácido fórmico em partes iguais¹¹. Após a descalcificação, as peças passaram pelo processamento laboratorial de rotina para sua inclusão em parafina. Os cortes semi-seriados com seis μ m de espessura foram corados pela hematoxilina e eosina e pelo tricrômico de Masson para estudo microscópico.

Resultados

▪ 10 Dias: Ambos os Grupos (Controle e Experimental) apresentaram loja cirúrgica com trabéculas ósseas delgadas e imaturas, com espaço inter-trabecular preenchido por tecido conjuntivo vascularizado, e rico em fibroblastos. No Grupo Experimental (figura 2) a neoformação óssea foi menor em todos os espécimes em relação ao Grupo Controle (figura 1).

▪ 20 Dias: Ambos os grupos (Controle e Experimental) apresentaram trabéculas ósseas ainda delgadas, só que no Grupo Experimental (figura 4) observou-se extensas áreas de tecido conjuntivo sem diferenciação óssea, com trabéculas mais isoladas em relação ao Grupo Controle (figura 3).

▪ 40 Dias: No Grupo Controle (figura 5), a loja cirúrgica estava totalmente preenchida de tecido ósseo neoformado, enquanto que no Grupo Experimental (figura 6) observou-se ainda áreas sem diferenciação óssea.

Discussão

Os resultados obtidos nesse experimento concordam com estudo dos efeitos do álcool no processo de reparo alveolar, que demonstraram que o álcool provocou um retardo na cronologia do processo de reparo alveolar, com trabéculas ósseas neoformadas não preenchendo o alvéolo no último tempo pós-

Figura 1 - Grupo C. 10 dias. Loja cirúrgica mostrando tecido ósseo imaturo com amplo espaço inter-trabecular preenchido de tecido conjuntivo. 63x.

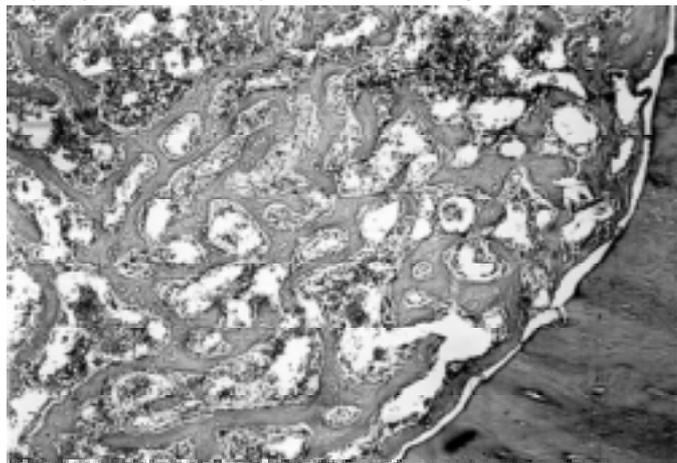


Figura 2 - Grupo E. 10 dias. Loja cirúrgica parcialmente ocupada por trabéculas ósseas delgada e isolada, e por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea. 63x.

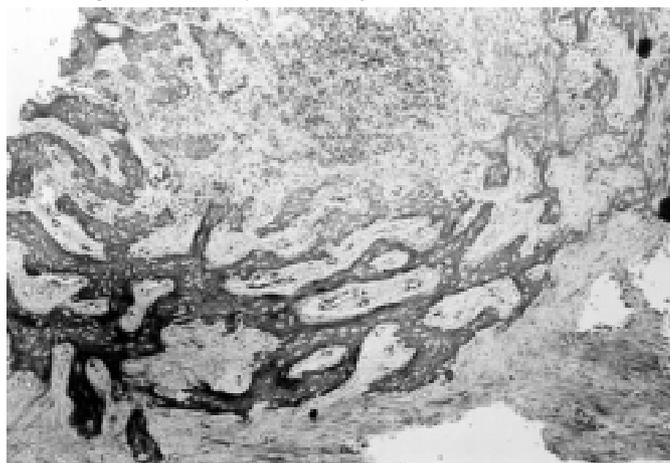


Figura 3 - Grupo C. 20 dias. Trabéculas ósseas ocupando parcialmente a loja cirúrgica, com amplo espaço inter-trabecular ocupado por tecido conjuntivo. 63x.

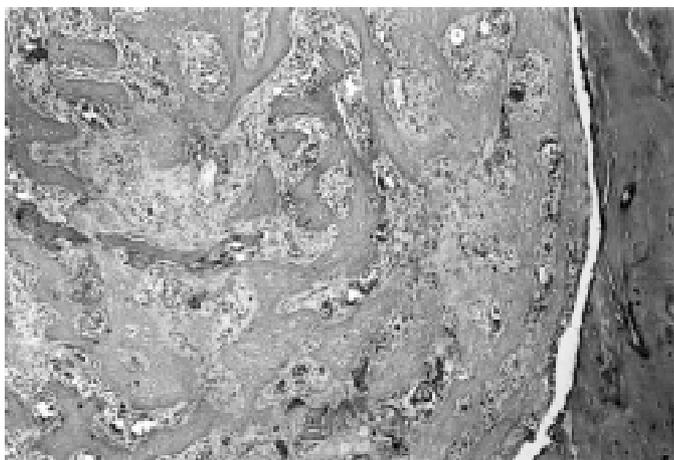


Figura 4 - Grupo E. 20 dias. Trabéculas ósseas delgadas e extensas áreas ocupadas por tecido conjuntivo sem diferenciação óssea. 63x.

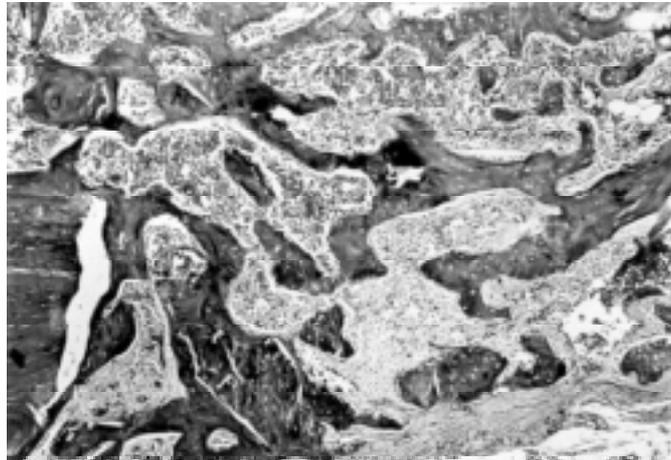


Figura 5 - Grupo C. 40 dias. Loja cirúrgica evidenciando trabéculas ósseas bem desenvolvidas, com canais medulares definidos. 160x.

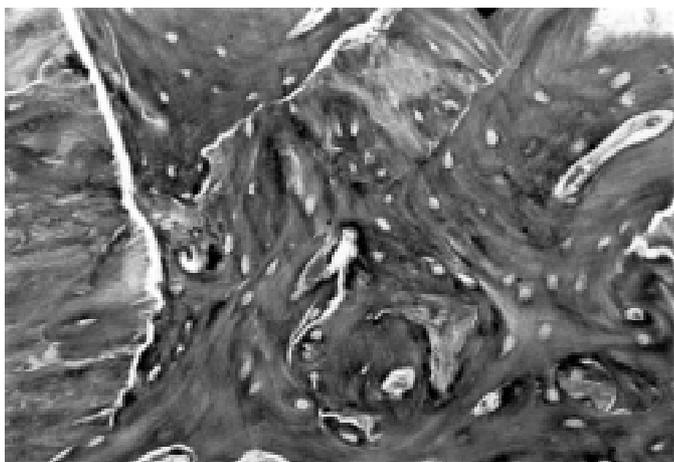
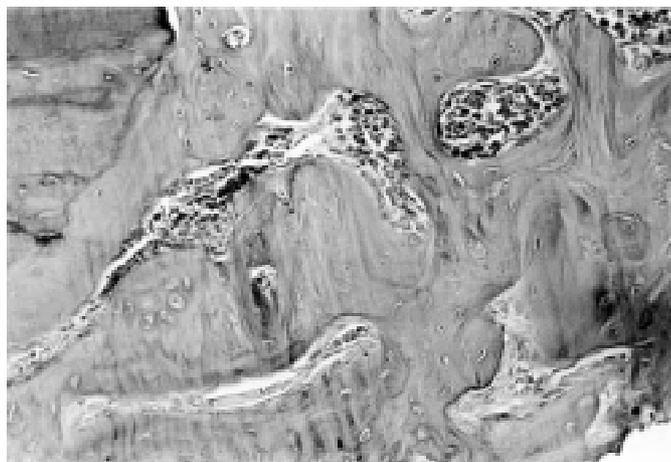


Figura 6 - Grupo E. 40 dias. Trabéculas ósseas espessas e áreas sem diferenciação óssea. 160x.



operatório e tecido ósseo mais imaturo¹².

Essa interferência do álcool no processo de reparo ósseo pode ser explicada por várias pesquisas, tais como o atraso no processo cicatricial por rarefação do colágeno causado por um estado subnutricional do rato¹³. O álcool possui vários efeitos na inibição da remodelação óssea⁹, contribuindo para desmineralização óssea progressiva³, geralmente por inibição da proliferação de osteoblastos^{4,6}, como observamos em nossa histologia.

Alguns autores associam essa inibição osteoblástica com um efeito do álcool inibindo a glândula paratireóide. Essa inibição causa hipercaleciúria temporária que contribui para o desenvolvimento de doenças ósseas⁵, redução na reabsorção óssea ativa e na formação óssea, com inibição na remodelação óssea pela ação do hormônio calcitropic¹⁴. O desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, provocada pelo álcool, atua de forma negativa na reparação óssea^{15,16}. Esse desequilíbrio pode ser agravado se o alcoolismo estiver associado ao fumo, que leva a diminuição da densidade mineral óssea, aumentando a incidência de quedas com fraturas e osteoporose^{4,9,17,18}.

Reduções regionais de 40-70% na densidade mineral óssea ocorreram após fraturas de ossos longos, e esta osteopenia pós-traumática pode persistir durante vários anos, talvez vitamínica¹⁹. A osteopenia é frequente em alcoólatras e sua patogênese parece ser multifatorial, incluindo ingestão de álcool, al-

terações hormonais, cirrose e má-nutrição²⁰.

Conclusões

É possível concluir que a dieta alcoólica influencia a neoformação óssea, em todas suas fases, retardando o preenchimento do osso em ratos submetidos a defeitos na tíbia.

Referências bibliográficas

1. Fish VB, Nelson VE. The distribution of alcohol in the tissues of the rat. *Proc Iowa Acad Sci* 1942;49:263-7.
2. Spencer H, Rubio N, Rubio E, Indreika M, Seitam A. Chronic alcoholism. Frequently overlooked cause of osteoporosis in men. *Am J Med* 1986 Mar;80(3):393-7.
3. Parra-Cabrera MS, Hernandez-Avila M, Tamayo Orozco JA, Fernandez Ortega MC, Meneses F. Risk factors in osteoporosis: clinical and epidemiologic evidenc. *Gac Med Mex* 1994 Jul-Aug;130(4): 31-40.
4. Klein RF, Carlos AS. Inhibition of osteoblastic cell proliferation and ornithine decarboxylase activity by ethanol. *Endocrinology* 1995;136(8):3406-11.
5. Garcia-Sanchez A, Gonzalez-Calvin JL, Diez-Ruiz A, Casals JL, Gallego-Rojo F, Salvatierra D. Effect of acute alcohol ingestion on mineral metabolism and osteoblastic function. *Alcohol Alcohol* 1995 Jul;30(4):449-53.
6. Klein RF, Fausti KA, Carlos AS. Ethanol inhibits human osteoblastic cell proliferation. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20(3):572-8.
7. Pastore K. Saúde: o perigo invisível da osteoporose. *Veja* 1997;1502(26):62-4.

8. Dias D, Ramos S, Luz Jr. EO, Hungria RD, Martinez C. The Brazilian Association for the Study of Alcohol and Other Drugs. *Addiction* 2002 Jan;97(1):9-13.
9. Bikle DD. Alcohol-induced bone disease. *World Rev Nutr Diet* 1993;73:53-79.
10. Elmali N, Ertem K, Ozen S, Inan M, Baysal T, Guner G, et al. Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26(4):509-13.
11. Morse A. Formic acid-sodium citrate descalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *J Dent Res* 1945;24(3/4):143-53.
12. Soubhia AMP. Processo de reparo alveolar em ratos tratados com aguardente de cana - estudo histológico [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia; 1984.
13. Muller SS. Efeito da subnutrição na consolidação da fratura da tíbia no rato [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina; 1991.
14. Bikle DD, Genant HK, Cann C, Recker RR, Halloran BP, Strewler GJ. Bone disease in alcohol abuse. *Ann Intern Med* 1985 Jul;103(1):42-8.
15. Nyquist F, Ljunghalls S, Berglund M, Obrant K. Biochemical markers of bone metabolism after short and long time ethanol withdrawal in alcoholics. *Bone* 1996 Jul; 19(1):51-4.
16. Dai J, Lin D, Zhang J, Habib P, Smith P, Murtha J, et al. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J Clin Invest* 2000;106(7): 887-95.
17. Lau EM, Cooper C. The epidemiology of osteoporosis. The oriental perspective in a world context. *Clin Orthop* 1996;(323):65-74.
18. Clark K, Sowers MR. Alcohol dependence, smoking status, reproductive characteristics, and bone mineral density in premenopausal women. *Res Nurs Health* 1996;19(5):399-408.
19. Nyquist F, Karlsson MK, Obrant KJ, Nilsson JA. Osteopenia in alcoholics after tibia shaft fractures. *Alcohol Alcohol* 1997 Sep-Oct;32(5):599-604.
20. Santolaria F, Gonzalez-Reimers E, Perez-Manzano JL, Milena A, Gómez-Rodríguez MA, Gonzalez-Díaz A, et al. Osteopenia assessed by body composition analysis is related to malnutrition in alcoholic patients. *Alcohol* 2000 Nov;22(3):147-57.

Correspondência:

Rogério Leone Buchaim
Rua Rosina Pegoraro, 51
17516-720 – Marília – SP
e-mail: rogerio@foa.unesp.br
