

## EFEITOS HISTOMORFOMÉTRICOS DO ALCOOLISMO CRÔNICO NO TECIDO ÓSSEO DE RATO WISTAR EM ENVELHECIMENTO

Cesar Augustus de Sousa Zocoler; José Renato Romero; Alexandre Sabbag da Silva; Eduardo Victor Pianca; Romeu Rodrigues de Souza

Universidade São Judas Tadeu, São Paulo. E-mail: ft.cesar.zocoler@gmail.com

### INTRODUÇÃO

A homeostase óssea é afetada pelo consumo inadequado de álcool, que pode desestabilizar o equilíbrio osteoblasto/osteoclasto com aumento da atividade dos osteoclastos e, conseqüentemente, reabsorção de tecido ósseo<sup>1</sup>. São escassos porém, trabalhos experimentais mostrando os efeitos quantitativos da ingestão crônica de álcool no tecido ósseo durante o envelhecimento.

O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da ingestão crônica de álcool na densidade do trabeculado ósseo e das fibras colágenas do osso esponjoso da porção proximal da tíbia utilizando como modelo o rato Wistar.

### METODOLOGIA

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 foto períodos de claro e escuro de 12 horas.

Aos 9 meses de idade, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos grupos: alcoólatra (AG, n=15) e controle (CG, n=15) não alcoólatras). O grupo GA recebeu como dieta líquida (método semi-voluntário) aguardente de cana (Pirassununga 51®, 39° GL, Indústrias Muller, Pirassununga, SP, Brasil) diluída em água com concentração controlada e progressiva conforme tabela 1. O grupo GC recebeu como dieta líquida somente água “*ad libitum*”.

**Tabela 1.** Protocolo utilizado para indução do alcoolismo crônico em ratos Wistar.

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

Ao término do período experimental, os animais foram pesados, eutanasiados e, depois de retiradas, as tíbias esquerdas foram processadas para obtenção de secções histológicas com 6- $\mu$ m de espessura.

A densidade óssea (%) da tíbia esquerda foi avaliada histometricamente em tres cortes histológicos de cada tíbia com aumento de x250. Um sistema teste composto por 35 pontos eqüidistantes (Figura. 1) e seguinte formula foi utilizada para obter o volume relativo do tecido ósseo e do colágeno:  $Vv_{[Estrutura]} = \frac{\sum P_{[Estrutura]}}{PT} \cdot 100$ ; onde:  $Vv_{[Estrutura]}$  = Volume Relativo;  $\sum P_{[Estrutura]}$  = Número de pontos sobre a estrutura e PT = Número Total number (35) do sistema teste.<sup>23</sup>

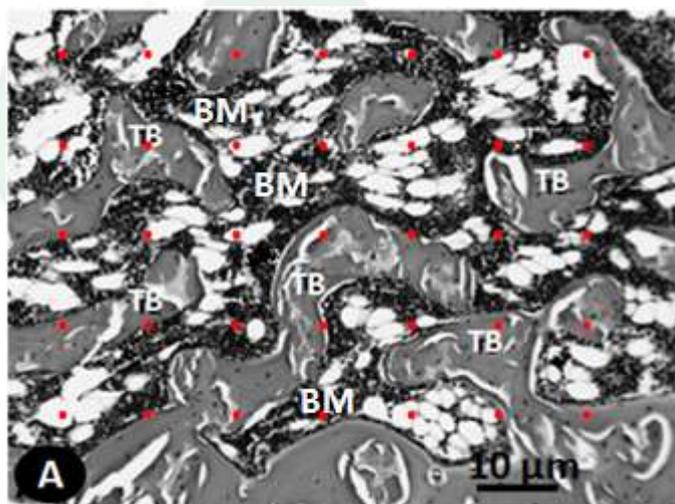


Figura 1- Fotomicrografia mostrando contagem sem vies utilizando um sistema teste com 35 pontos (em vermelho) superposto ao tecido esponjoso da tíbia proximal. TB-Trabeculas. BM-.

Outras 3 secções histológicas de cada tíbia foram aleatoriamente coletadas, coradas pelo Picosirius e utilizadas para análise das fibras colágenas dos grupos CG e AG utilizando o sistema teste. Os resultados foram apresentados como media e desvio padrão e comparados pelo teste t de Student.  $P < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Ao final do experimento, o peso corporal do grupo controle foi de  $364 \pm 10$  g e do grupo alcoólico  $308 \pm 12$  g ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2A). As tíbias do grupo CG apresentaram densidade óssea aproximadamente 2.5 vezes maior do que as tíbias do grupo AG (figura 2B).

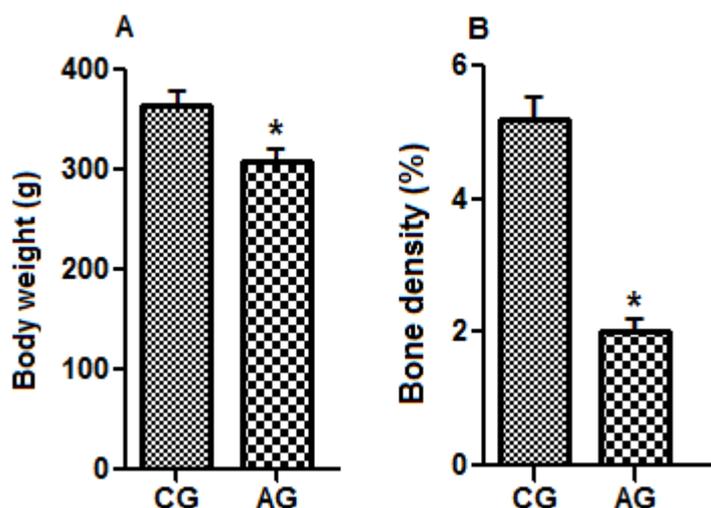


Figura 2- A – Peso corporal dos animais no centésimo dia de experimento. O AG apresentou perda de peso significativa em relação ao CG. \*( $p < 0.05$ ).

**B-** Densidade óssea dos grupos de estudo. A densidade do AG foi cerca de x 2.5 menor do que a do CG \*( $p < 0.05$ ).

No grupo CG houve predominância de fibras colágenas maduras (birrefringência amarelada/alaranjada) em relação as imaturas (birrefringência esverdeada) e no AG (B), predominância de fibras colágenas imaturas (birrefringência esverdeada) em relação às maduras (birrefringência amarelo-alaranjada) (Figuras 3,4).

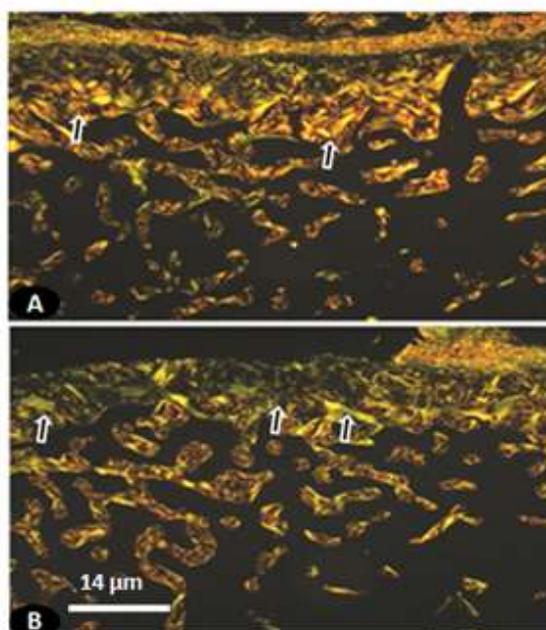


Figure 3 – Cortes histológicos do tecido ósseo da porção proximal da tíbia corados pelo Picrossirius, mostrando no CG (A) predominância de fibras colágenas maduras (birrefringência amarelada/alaranjada) em relação as imaturas (birrefringência esverdeada) e no AG (B), predominância de fibras colágenas imaturas (birrefringência esverdeada) em relação às maduras (birrefringência amarelo-alaranjada). As setas mostram em A, fibras colágenas maduras e em B, fibras colágenas imaturas.

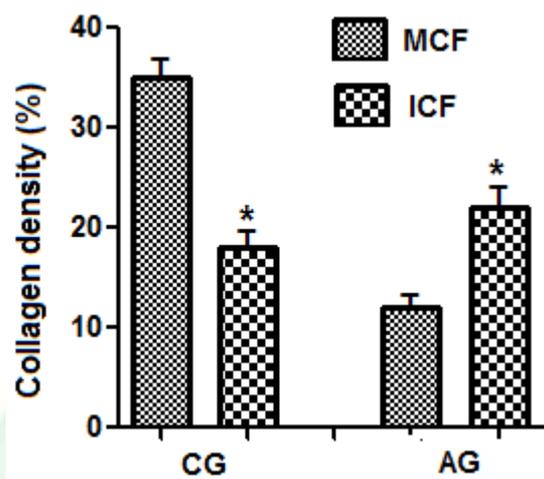


Figura 4- Densidade de fibras colágenas maduras (MCF) e imaturas (ICF) (%) no tecido ósseo dos grupos CG e AG. \* $p < 0.05$ )

## DISCUSSÃO

Os resultados obtidos confirmam a de outros autores que ratos submetidos à dieta líquida com solução alcoólica apresentam ganho de peso menor do que os do grupo controle.<sup>4,5,6,7,8,9</sup> No presente estudo, animais do grupo alcoólico mostraram retardo no processo de remodelação óssea em concordância com os achados de outros autores.<sup>10,11,12</sup>

É sabido que as fibras colágenas desempenham um importante papel na manutenção e integridade estrutural dos tecidos onde se encontram<sup>13</sup>, mostrando modificações quando há desequilíbrio.<sup>14</sup>

No presente estudo no grupo álcool fibras colágenas imaturas foram observadas com maior presença, demonstrando menor grau de desenvolvimento estrutural, sugerindo possível atraso no processo de neoformação óssea. Os tipos de fibras colágenas foram identificadas pelo seu grau de maturação, como outros autores.<sup>15,16</sup>

## CONCLUSÃO:

Os grupos de ratos submetidos a ingestão alcoólica mostram diminuição de peso e da densidade do trabeculado ósseo quando comparados ao grupo controle.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-Eastell R, Boyle IT, Compston J, Cooper C, Fogelman I, Francis RM, Hosking DJ, Purdie DW, Ralston S, Reeve J, Reid DM, Russell RG, Stevenson JC. Management of male osteoporosis: report of the UK Consensus Group. *QJM*. 1998 Feb;91(2):71-92.
- 2-Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF (1988). The stereological tools: dissector, fractionator and point sampled intercepts and their use in pathological research. *Apmis* 96, 857-881.
- 3-Mayhew TM, Lucocq JM. Developments in cell biology for quantitative immunoelectron microscopy based on thin sections: a review. *Histochem Cell Biol*. 2008 Aug;130(2):299-313. doi: 10.1007/s00418-008-0451-6.
- 4-Saville PD -Changes in bone mass with age and alcoholism.. *J Bone Joint Surg Am*. 1965 Apr;47:492-9.
- 5-Oppenheim BE, Cantez S What causes lower neck uptake in bone scans? . *Radiology*. 1977 Sep;124(3):749-52.
- 6-Krishnamra N, Limlomwongse L. The acute hypocalcaemic effect of ethanol and its mechanism of action in the rat. *Can J Physiol Pharmacol*. 1983 Apr;61(4):388-94.
- 7-faustino SE, Stipp AC. Effects of chronic alcoholism and alcoholic detoxication on rat submandibular glands: morphometric study. *J Appl Oral Sci*. 2003 Mar;11(1):21-6.
- 8-Schuckit MA.-Alcohol-use disorders. *Lancet*. 2009 Feb 7; 373(9662): 492-501.
- 9-Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffre C. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporosis International*. 2012; 23(1): 1-16.
- 10-Hogan HA, Sampson HW, Cashier E, Ledoux N. Alcohol consumption by young actively growing rats: a study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21:809–16.
- 11-Buchaim RL, Buchaim DV, Andreo JC, Roque DD, Roque JS, Rodrigues AC. Effects of thee alcocholic diets on the bone repair in the tibia of rats. *Ciênc. Odontol. Bras*. 2009; 12(2): 17-23.
- 12-Lima CC, Silva TD, Santos L, Nakanaki WR, Loyola YCS, Resck MCC, CAMILLI JA, Soares EA, Garcia JAD. Effects of ethanol on the osteogenesis around porous hydroxyapatite implants. *Brazilian Journal of Biology*. 2011; 71(1).

13-Rich L, Whittaker P. COLLAGEN AND PICROSIRIUS RED STAINING: A POLARIZED LIGHT ASSESSMENT OF FIBRILLAR HUE AND SPATIAL DISTRIBUTION. Braz. J. morphol. Sci. 2005; 22(2):97-104.

14-Zhang J, Dai J, Lin DL, et al. Osteoprotegerin abrogates chronic alcohol ingestion-induced bone loss in mice. J Bone Miner Res 2002;17:1256–63.

15-Hirshberg A, Lib M, Kozlovsky A, Kaplan I. The influence of inflammation on the polarization colors of collagen fibers in the wall of odontogenic keratocyst. Oral Oncol 2007; 43 (3): 278-282.

16-Retamoso LB, Montagner F, Camargo ES, Farinazzo VLW, Tanaka OM. Polarized Light Microscopic Analysis of Bone Formation After Inhibition of Cyclooxygenase 1 and 2. The Anatomical Record. 2010; 293 (2): 195–199.