

EFEITO DO ALCOOLISMO CRÔNICO SOBRE A DENSIDADE E O REPARO ÓSSEO EM TIBIAS DE RATOS: ESTUDO HISTOMÉTRICO E IMUNOHISTOQUÍMICO.

JOSÉ RENATO ROMERO; ALEXANDRE SABBAG DA SILVA; EVERTON LUIZ DOS SANTOS; CAROLINE GALATTI MOURA COELHO; RENATO PAULO CHOPARD
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - SÃO PAULO – BRASIL
UNIVERSIDADE GUARULHOS – GUARULHOS – SÃO PAULO - BRASIL
email: j.rromero@ig.com.br

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, sua remodelação leva à restauração e consequente integridade do esqueleto, sendo o seu metabolismo influenciado por fatores hormonais, locais, comportamentais, ambientais e nutricionais. 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 reparo ósseo e densidade óssea em ratos Wistar, além de observarmos a expressão de OPG e RANKL. Separamos 30 ratos Wistar, sendo (G1) 15 ratos consumindo solução de aguardente diluída em água por 100 dias com concentração progressiva e controlada 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 tibia. 8 dias após o procedimento cirúrgico os animais foram eutanasiados e as tíbias removidas. A porcentagem de osso neoformado e a densidade óssea foram avaliadas histometricamente. Através da imunohistoquímica observamos a expressão de OPG e RANKL. Como resultados, pudemos observar que a densidade e remodelação ósseas foram menores no grupo alcoólico. Encontramos também diferenciação na expressão de RANKL e OPG nos diferentes grupos. Nossos resultados demonstram que o protocolo proposto de ingestão de álcool exerce efeitos negativos na qualidade óssea quando comparado ao grupo controle.

Palavras Chave: Alcoolismo, Densidade óssea, Remodelação óssea.

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.

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).

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, conseqüentemente, 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).

OBJETIVOS

- Caracterizar as eventuais alterações morfológicas e histoquímicas no tecido ósseo de ratos submetidos a uma ingestão progressiva e controlada de álcool.
- Quantificar por histomorfometria a densidade e neoformação óssea nas tíbias;
- Analisar a expressão de OPG e RANKL nas tíbias.

MATERIAL E MÉTODOS

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 ®, 39° GL, Indústrias Muller, Pirassununga, SP, Brasil) diluída em água com concentração controlada e progressiva conforme tabela 1. Já o não alcoólatra (G2) recebeu como dieta líquida somente água “*ad libitum*”.

Tabela1. Protocolo de indução ao alcoolismo crônico

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

RESULTADOS

A análise histométrica dos cortes (figura 1) 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) (figura 2).

A análise estatística da área óssea neoformada expressas em mm², demonstrou que a área de osso neoformado (figura 3) no grupo controle é 34% maior do que a área de osso neoformado no grupo álcool (figura 4).

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 5). Verificamos, também, que a quantidade de marcações de RANKL e OPG no grupo controle foram similares e em maior quantidade (Figura 6).

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

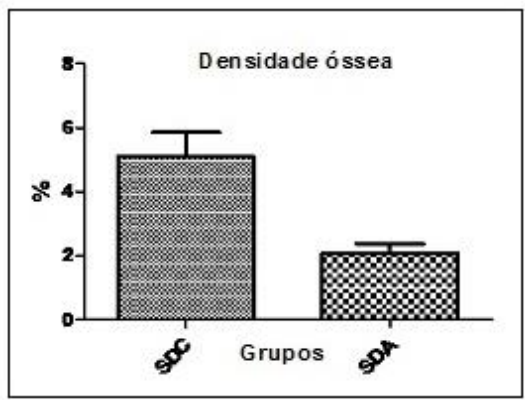


Figura 2. Análise estatística da Densidade óssea dos grupos de estudo

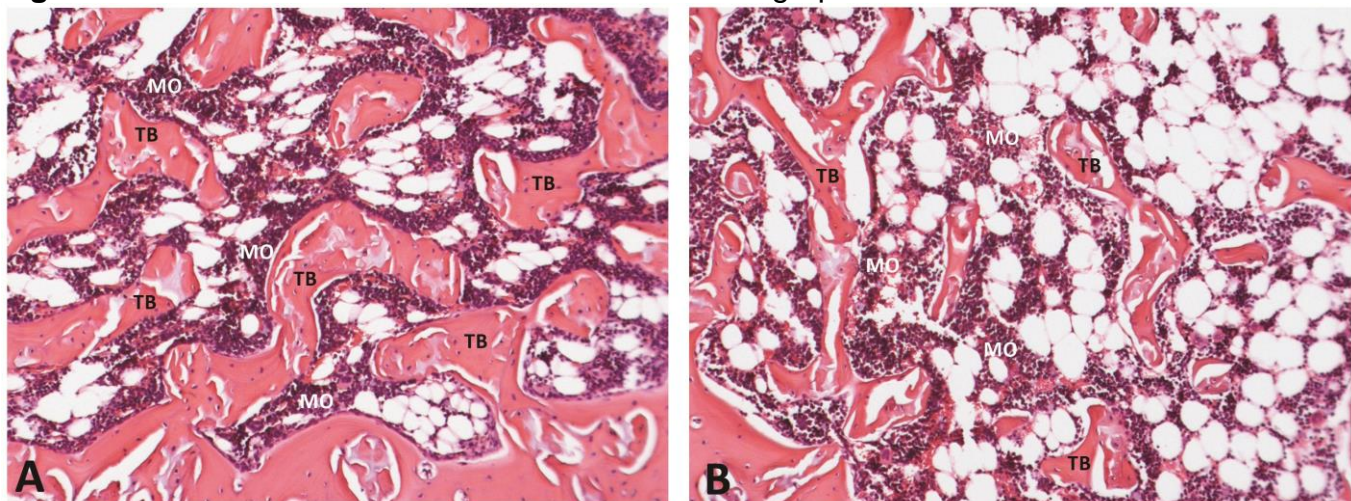


Figura 1. Análise histométrica dos cortes comparando grupo controle (A) e grupo de estudo (B) em relação à densidade óssea.

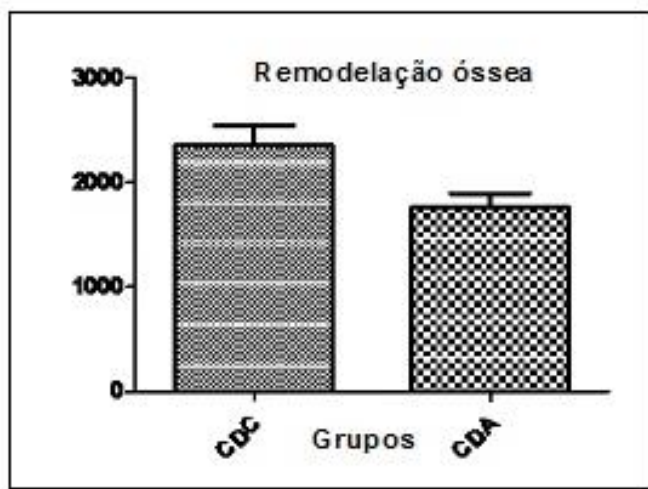


Figura 3. Análise estatística da área óssea neoformada expressas em mm²

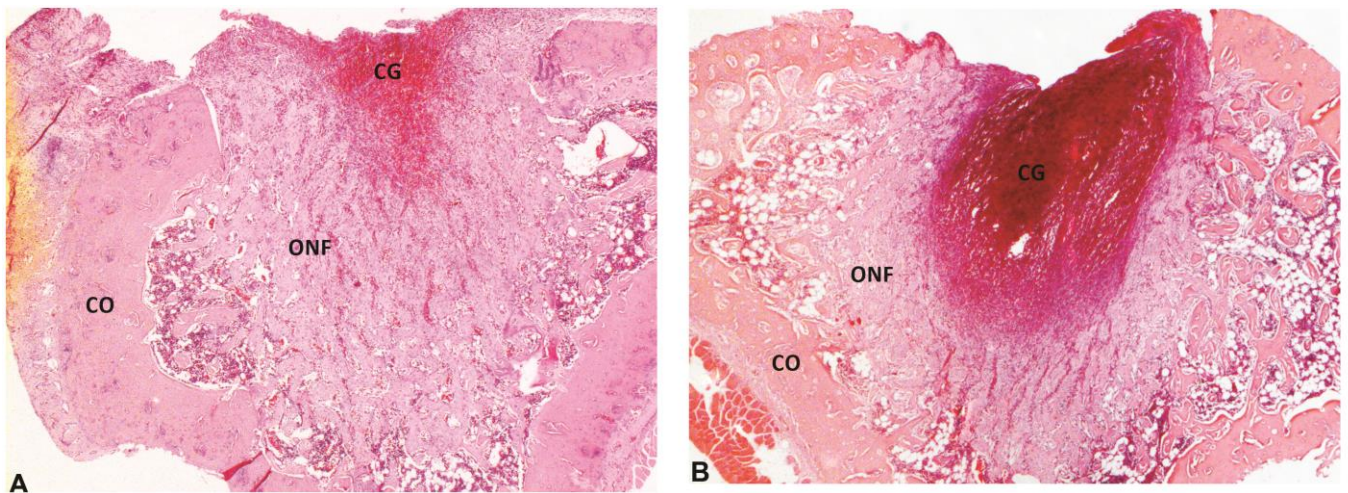


Figura 4. Análise histométrica da área de osso neoformado comparando grupo controle (A) e grupo de estudo (B)

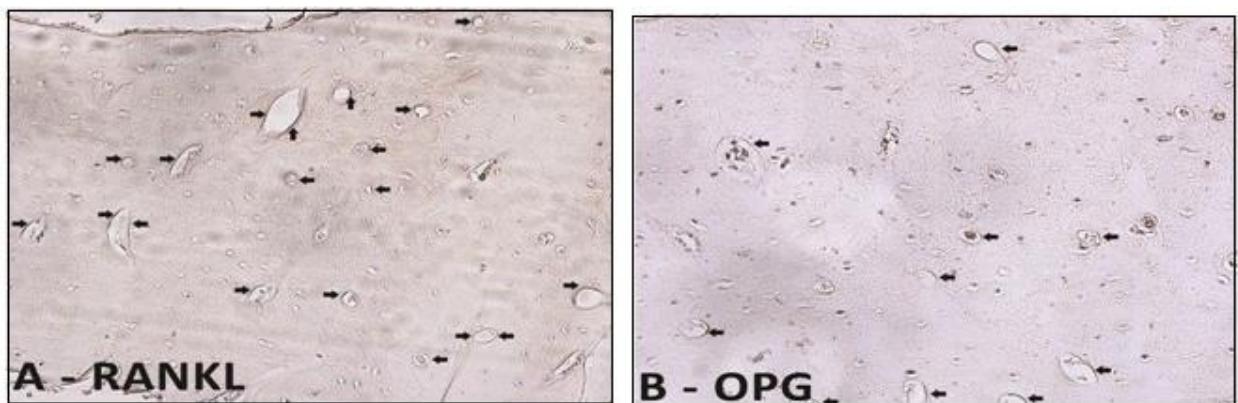


Figura 5. Marcações de RANKL e OPG do grupo de estudo.

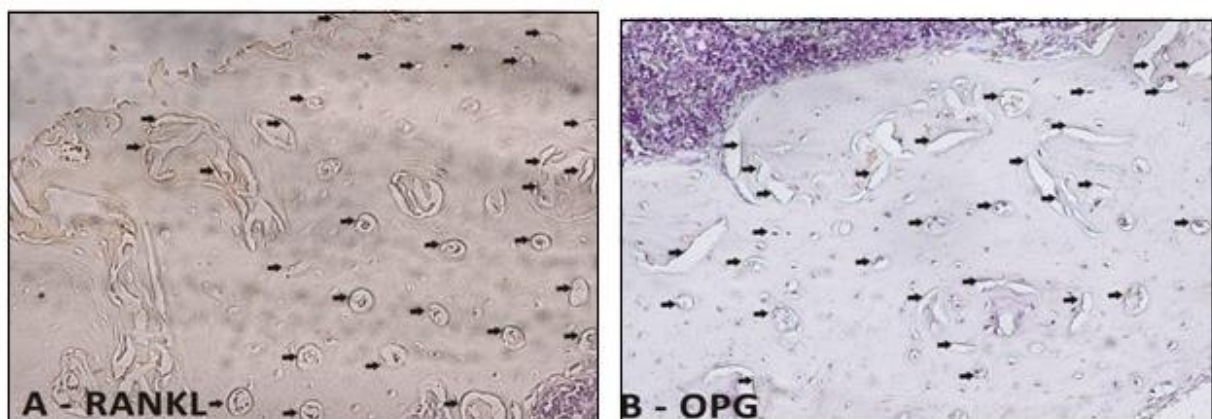


Figura 6. Marcações de RANKL e OPG do grupo controle.

DISCUSSÃO

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).

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 análise das tíbias demonstrou que as diferentes concentrações alcoólicas utilizadas na dieta influenciaram a neoformação 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 a remodelação óssea nos ratos do grupo álcool sofreu atraso. Esses resultados sugerem um possível efeito negativo 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). 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 conseqüentemente, 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, conseqüentemente, 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).

CONCLUSÃO

Após a análise 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;

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

Palavras-chave: Alcoolismo crônico. Densidade óssea. Remodelação óssea .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANANDARAJAH, A.P. Role of Rankl in bone diseases. **Trends endocrinol metab.** V. 20 n 2 p 88-94 , 2009
- 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*) submitted 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.
- ARNOW,B.A. Relationships between childhood maltreatment, adult health and psychiatric outcomes, and medical utilization. **Journal Clinical Psychiatry**, v.65 n.3,p. 10-15.2004
- 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.
- 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.
- CALLACI, J.J.; HIMES, R.; LAUING, K.; WEZEMAN, F.H.; BROWNSON, K. Bingealcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. **Calcif Tissue Int** ,v. 84, p 87- 92, 2010
- 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, PLACKETTI, 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.
- 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, 2011.474–48, 2009.
- 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
- 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
- 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.

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

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.

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.

Rua: Dona Dica, 530 – Jardim Tranqüilidade – Guarulhos – São Paulo – Brasil, CEP: 07052-000 (11) 23589246 j.romero@ig.com.br