

ANÁLISE DA DENSIDADE ÓSSEA RADIOGRÁFICA DE RATOS SUBMETIDOS AO ALCOOLISMO CRÔNICO UTILIZANDO IMAGEM DIGITAL*

RADIOGRAPHIC BONE DENSITY ANALYSIS OF RATS SUBMITTED TO CRONICAL ALCOHOLISM USING DIGITAL IMAGE

Silva, Alan Roger dos Santos**
Ribeiro, Ana Carolina Prado**
Salzedas, Leda Maria Pescinini***
Soubhia, Ana Maria Pires****
Sundefeld, Maria Lucia Maçal Mazza*****

RESUMO

O efeito do alcoolismo crônico sobre a densidade óssea é pouco compreendido. O objetivo deste estudo foi avaliar a densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico, utilizando o sistema de imagem digital Digora. Foram utilizados 20 animais (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), divididos em grupo controle e experimental. Os animais do grupo experimental receberam aguardente de cana-de-açúcar *ad libitum* em concentrações crescentes: 30% por 10 dias, 60% por 10 dias e aguardente pura por 40 dias. Todos os animais foram sacrificados após 60 dias. Foram obtidas imagens digitais dos fêmures direitos de cada animal e a densidade radiográfica mensurada no terço médio e côndilo do fêmur. Os valores obtidos foram analisados pelo teste t de Student e verificou-se diferença significativa entre os grupos controle e experimental no terço médio ($p = 0,04$) e côndilo do fêmur ($p = 0,01$). Estes resultados indicam valores de densidade óssea radiográfica reduzida no terço médio e côndilo do fêmur em animais submetidos ao alcoolismo crônico.

UNITERMOS: densitometria óssea; densidade óptica radiográfica; alcoolismo; imagem digital.

SUMMARY

*The cronical effect of alcoholism on bone density is little known. The purpose of this study was to evaluate radiographic bone density of rats submitted to cronical alcoholism using Digora's digital image system. Twenty animals (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar) were used and divided in control and experimental group. The animals of experimental group received sugar cane brandy *ad libitum* in growing concentrations: 30% during ten days, 60% during 10 days and pure sugar cane brandy for 40 days. All animals were sacrificed after 60 days. Digital images were obtained from the right femurs of each animal and the radiographic density measured on the medium third and femur's condyle. The obtained values were analyzed by the Student's t test and significant difference between the groups were find at the medium third ($p = 0,04$) and femur's condyle ($p = 0,01$). These results indicate reduced values of radiographic bone density at medium third and femur's condyle of the animals submitted to cronical alcoholism.*

UNITERMS: bone densitometry; radiographic optical density; alcoholism; digital image.

* Apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq/PIBIC – Processo nº 107951/2004 -5 – Iniciação Científica.

** Graduandos do curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

*** Doutora. Professora Assistente da Disciplina de Radiologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

**** Professora Adjunto da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

***** Doutora. Professora Assistente da Disciplina de Bioestatística da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

INTRODUÇÃO

Um dos hábitos sociais mais antigos e disseminados entre as populações é o consumo de álcool, não só por estar associado a ritos religiosos, mas também por se atribuir a ele uma variedade de efeitos como calmante, afrodisíaco, estimulante de apetite e desinibidor (Cardin et al., 1986 apud Oliveira e Luis,¹⁶ 1996). No Brasil 2 bilhões de litros de cachaça ou aguardente de cana-de-açúcar foram produzidos no ano de 2001 e distribuídos em mais de 960 mil pontos de venda, sendo portanto a bebida destilada mais consumida no país ocupando o segundo lugar dentre as bebidas alcoólicas (<http://www.alcoolismo.com.br>).²⁴ Aproximadamente 10% dos consumidores de álcool desenvolvem o quadro de dependência (alcooolismo), caracterizado por alterações sociais, psicológicas e orgânicas (American Psychiatric Association, 1987 apud Almeida e Coutinho,¹ 1993).

O consumo crônico de álcool causa uma multiplicidade de anormalidades bioquímicas, fisiológicas e clínicas como cirrose hepática, hipoproteinemia, ascite, anemia macrocítica, alterações neurológicas e deficiências vitamínicas (Larato, 1972 apud Tirapelli et al.,²¹ 2001), com relatos de maior incidência de fraturas ósseas, especialmente no fêmur, em alcoólatras (Chen et al.,⁵ 2001). Apesar de diversos estudos demonstrarem que o consumo crônico de álcool diminui o volume ósseo trabecular e prejudica a formação óssea em ratos (Chen et al.,⁵ 2001; Nishiguchi et al.,¹⁴ 2000, Buchaim et al.,³ 2002), o mecanismo pelo qual o alcooolismo influencia no metabolismo ósseo não é completamente compreendido (Nyquist et al.,¹⁵ 2002). Parece existir uma ação direta do álcool sobre a atividade osteoblástica (Brown et al.,² 2002; Chen et al.,⁵ 2001; Daí et al.,⁷ 2000), e uma ação indireta sobre os hormônios reguladores do metabolismo ósseo (Keiver et al.,⁹ 2003; Chen et al.,⁵ 2001; Nishiguchi et al.,¹⁴ 2000). Enquanto alguns autores acreditam que o uso crônico do álcool pode interferir no metabolismo ósseo e causar osteoporose (Nishiguchi et al.,¹⁴ 2000), outros crêem que apesar do etanol exercer um impacto negativo no conteúdo mineral dos ossos, ele não influencia em suas propriedades mecânicas (Nyquist et al.,¹⁵ 2002). Os efeitos colaterais secundários do etanol como traumas repetitivos associados à embriaguez, má-nutrição e doenças hepáticas seriam as causas predominantes para a alta incidência de fraturas ósseas entre os alcoólatras (Nyquist et al.,¹⁵ 2002).

Os tecidos calcificados podem ser avaliados pelas imagens radiográficas utilizando a densidade radiográfica (densitometria), tendo como padrão e termo de comparação um dispositivo com degraus de alumínio (penetrômetro) posicionado ao lado do elemento radiografado, no ato da tomada radiográfica. Os valores de densidade radiográfica passam a ser expressos em termos de equivalência em milímetros de alumínio (Cook,⁶ 1981; Prevost,²⁰ 1990 e Willians,²³ 1987). Louzada et al.,^{11,12} (1998a,b) apresentaram uma metodologia de técnica densitométrica com a obtenção da espessura equivalente em milímetros de alumínio, utilizando a setorização da curva densitométrica em imagens radiográficas digitalizadas, tendo demonstrado sua viabilidade de emprego, precisão e reprodutibilidade.

A imagem digital surgiu como um recurso rápido e de fácil avaliação e tem sido utilizada largamente na odontologia (Gurdal et al.,⁸ 1998). O uso da radiografia digital é muito flexível, como mostra Vulcano et al.²² (1997) que desenvolveram um estudo utilizando a técnica de densitometria óptica radiográfica para determinar a densidade óssea do carpo ulnar de equinos em crescimento, buscando padronizar os valores normais de densidade óssea. O sistema digital Digora tem sido utilizado em odontologia, com recursos de manipulação de imagem (invertida, 3D, contraste) e obtenção de medidas de distância e densidade radiográfica (Canova et al.,⁴ 2003; Meurer et al.,¹³ 2003; Licks et al.,¹⁰ 2004). A associação do recurso de densitometria em imagem digital e expressão desses valores em milímetros de alumínio possibilita maior precisão e confiabilidade nos valores densitométricos obtidos (Oliveira-Filho et al.,¹⁷ 2003; Oliveira-Filho et al.,¹⁸ 2004).

Considerando o consumo abusivo de aguardente de cana-de-açúcar no Brasil, a elevada prevalência de 6% para o alcooolismo na população brasileira (Almeida e Coutinho,¹ 1993) e o amplo espectro de ação do álcool quando consumido cronicamente, este estudo tem como objetivo avaliar a densidade óssea radiográfica em fêmures de ratos submetidos ao alcooolismo crônico por aguardente de cana-de-açúcar, utilizando a imagem digital.

MATERIAL E MÉTODO

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética na experimentação animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, protocolo n° 05/04.

Para a realização do trabalho foram utilizados 20 ratos (*Rattus norvegicus*, albinus, Wistar), distribuídos em 10 deles para o Grupo Controle, e os outros 10 para o Grupo Experimental. Todos os animais foram alojados em ambiente com exaustão do ar e separados em um número máximo de 5 animais por gaiola.

I – GRUPO CONTROLE: Os animais deste grupo foram tratados com ração comercial e água *ad libitum* por um período de 60 dias.

II – GRUPO EXPERIMENTAL: Os animais deste grupo receberam ração comercial e solução de aguardente de cana-de-açúcar (40° GL) *ad libitum* em concentrações crescentes da seguinte forma: nos primeiros 10 dias os animais receberam solução de aguardente de cana-de-açúcar a 30%, nos 10 dias subseqüentes, solução de aguardente de cana-de-açúcar a 60%, e a partir do 21° dia, aguardente de cana-de-açúcar pura por um período de 40 dias, totalizando 60 dias de tratamento.

Para a melhor seleção dos animais e com a finalidade de conseguir um grupo de trabalho homogêneo, a cada 3 dias foram controlados os pesos, o consumo de ração, de água e de solução de aguardente de cana-de-açúcar.

Os animais, após o período de tratamento de 60 dias, foram sacrificados e removidos os fêmures direitos.

Cada fêmur retirado dos animais dos Grupos Controle e Experimental foi fixado em formol por 48 horas. As peças foram dissecadas para remoção de tecidos moles e submetidas ao exame radiográfico.

Para a obtenção das imagens radiográficas foi utilizado o aparelho de raios-X GE-100 (General Electric, Milwaukee, EUA), operando com 50 kvp, 10 mA, 12 impulsos. A distância foco-filme foi de 30 cm, com incidência perpendicular ao plano filme-objeto. A imagem digital direta foi obtida com a placa óptica do sistema digital Digora (Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finland). Como referencial densitométrico, nas tomadas radiográficas, foi utilizado um penetrômetro de alumínio (liga 6063, ABNT) de 9 graus. Sobre cada placa óptica foram colocados uma peça óssea (fêmur), o penetrômetro e uma identificação com letras de chumbo. Foram obtidas 10 imagens para cada grupo (controle e tratado), totalizando 20 imagens.

As leituras das placas ópticas sensibilizadas foram efetuadas em escaner a laser do próprio equipamento Digora, e as imagens manipuladas no software Digora for Windows 1.51. Este software possibilita, entre outros recursos, a determinação

da densidade radiográfica (análise densitométrica), ou seja, a radiopacidade de um determinado objeto, através de seus níveis de cinza. Foram selecionadas áreas de tamanho padronizado para leitura no terço médio (60 × 20 pixels) e côndilo (20 × 20 pixels) do fêmur, sendo utilizado o valor de densidade média para os cálculos necessários (Figuras 1 e 2). Foram efetuadas 3 repetições de medidas em cada uma das áreas, em cada imagem, e calculadas as médias dessas repetições, correspondendo à densidade radiográfica da área. Este valor de densidade radiográfica foi convertido em milímetros de alumínio – mmAl (Tabelas 1 e 2) a partir de uma equação obtida no gráfico de dispersão relacionando os valores de radiopacidade de cada degrau de alumínio e sua espessura correspondente. Os valores em mmAl foram submetidos à análise estatística pelo teste t de Student para comparação entre os grupos controle e experimental.

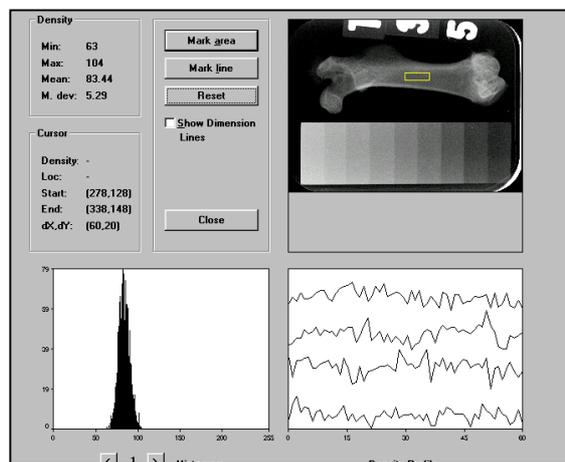


Figura 1 – Determinação da densidade radiográfica do terço médio do fêmur (Digora for Windows 1.51).

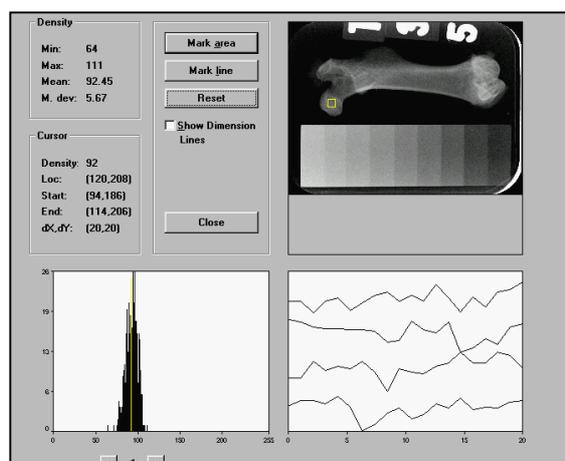


Figura 2 – Determinação da densidade radiográfica do côndilo do fêmur (Digora for Windows 1.51).

RESULTADOS

Os valores da densidade radiográfica analisados estatisticamente, usando o teste t de *Student*, demonstraram existir diferença significativa entre os valores de densidade radiográfica obtidos nas duas áreas analisadas, terço médio ($p = 0,04$) e côndilo do fêmur ($p = 0,01$), comparando os grupos controle e experimental (Tabelas 1 e 2). O grupo experimental apresentou valor de densidade radiográfica óssea inferior ao controle em ambas as áreas analisadas.

TABELA 1 – Densidade óssea radiográfica do terço médio dos fêmures em mmAl.

	Grupo Controle	Grupo Tratado
animal 1	1,78 mmAl	1,46 mmAl
animal 2	2,41 mmAl	1,48 mmAl
animal 3	2,21 mmAl	1,64 mmAl
animal 4	1,34 mmAl	1,33 mmAl
animal 5	1,66 mmAl	1,53 mmAl
animal 6	1,39 mmAl	1,47 mmAl
animal 7	1,59 mmAl	1,47 mmAl
animal 8	1,47 mmAl	1,23 mmAl
animal 9	1,66 mmAl	1,49 mmAl
animal 10	1,59 mmAl	1,46 mmAl

$p = 0,04$ estatisticamente significativo.

TABELA 2 – Densidade óssea radiográfica dos côndilos dos fêmures em mmAl.

	Grupo Controle	Grupo Tratado
animal 1	2,94 mmAl	1,81 mmAl
animal 2	1,78 mmAl	1,96 mmAl
animal 3	2,29 mmAl	1,81 mmAl
animal 4	2,30 mmAl	1,79 mmAl
animal 5	2,49 mmAl	2,21 mmAl
animal 6	2,02 mmAl	2,11 mmAl
animal 7	2,33 mmAl	2,33 mmAl
animal 8	2,05 mmAl	2,03 mmAl
animal 9	2,52 mmAl	1,99 mmAl
animal 10	2,42 mmAl	1,76 mmAl

$p = 0,01$ estatisticamente significativo.

DISCUSSÃO

O tecido ósseo está em constante remodelação e sua massa total depende da relação de equilíbrio existente entre a formação e a reabsorção óssea. O uso prolongado e excessivo de álcool causa

alterações no metabolismo ósseo, com modificação no conteúdo orgânico mineral que pode ser detectável por vários métodos, entre eles a análise de densidade óssea radiográfica que tem sido utilizada como recurso mais acessível na avaliação óssea (Meurer et al.,¹³ 2003; Zecchin et al.,²⁵ 2004).

Louzada et al.¹¹ (1998a) ao utilizar a técnica de densitometria óptica radiográfica com conversão em mmAl no acompanhamento de variação de massa em peças ósseas de cães, mimetizando o processo de desmineralização óssea, demonstrou praticidade, precisão e sensibilidade da metodologia proposta. Sendo importante a padronização nesta metodologia já que as análises são feitas de forma relativa usando um objeto de referência, neste sentido, é proposta a utilização da análise digital para evitar erros oriundos do processamento radiográfico (Puppín, 1997 apud Pereira et al.,¹⁹ 2004; Oliveira-Filho,¹⁷ 2003).

Esta pesquisa, ao analisar a densidade radiográfica do terço médio e côndilo do fêmur de animais submetidos ao alcoolismo crônico, utilizando imagem digital, encontrou valores inferiores aos do grupo controle. Estes resultados estão de acordo com os estudos de Brown et al.,² (2002), Nyquist et al.,¹⁵ (2002) e Nishiguchi et al.¹⁴ (2000).

Estudos prévios demonstraram que o alcoolismo diminui o volume ósseo trabecular e prejudica a formação óssea em ratos resultando em diminuição do número total de osteoblastos, contudo, o mecanismo de osteopenia associado ao alcoolismo não está completamente elucidado. Apesar disto, parece existir uma ação direta do álcool nas células ósseas mostrada por estudos diretos da função osteoblástica que indicam que o etanol reduz significativamente o número de osteoblastos e inibe diretamente a proliferação e a atividade das células osteoblásticas (Brown et al.,² 2002; Chen et al.,⁵ 2001; Daí et al.,⁷ 2000), e uma ação indireta ou moduladora sobre os hormônios reguladores do metabolismo ósseo, como metabólitos da vitamina D, calcitonina, paratormônio, testosterona e glicocorticóides (Keiver e Weinberg,⁹ 2003; Chen et al.,⁵ 2001; Nishiguchi et al.,¹⁴ 2000). Além do efeito direto do álcool sobre o metabolismo ósseo, a deficiência na dieta dos alcoólatras e possíveis danos hepáticos gerados pelo álcool são outros fatores citados na literatura com potencial deletério sobre o metabolismo ósseo (Brown et al.,² 2002; Nyquist et al.,¹⁵ 2002).

Apesar deste e outros estudos (Nishiguchi et al.,¹⁴ 2000; Nyquist et al.,¹⁵ 2002) terem encontrado valores inferiores de densidade óssea radio-

gráfica nos animais submetidos ao alcoolismo, e de autores como Chen⁵ (2001) terem encontrado maior incidência de fraturas ósseas no fêmur de alcoólatras, não parece existir uma diferença nas características biomecânicas do fêmur destes animais (Nishiguchi et al.,¹⁴ 2000; Nyquist et al.,¹⁵ 2002). Mais estudos devem ser conduzidos para esclarecer se a redução da densidade óssea radiográfica em animais submetidos ao alcoolismo crônico ocorre devido a ação direta do álcool sobre o metabolismo ósseo ou se as alterações hepáticas e sistêmicas oriundas do alcoolismo é quem causam danos à qualidade óssea dos animais.

CONCLUSÃO

A densidade óssea radiográfica do terço médio e do côndilo do fêmur dos animais submetidos ao alcoolismo crônico foi menor que a dos animais do grupo controle.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida LM e Coutinho ESF. Prevalência de consumo de bebidas alcoólicas e de alcoolismo em uma região metropolitana do Brasil. *Revista de Saúde Pública*. 1993;27(1).
- Brown EC et al. Skeletal toxicity associated with chronic ethanol exposure in a rat model using total enteral nutrition. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002;301(3): 1132-8.
- Buchaim RL, Roque DD, Roque JS, Toledo Filho JL, Andreo JC, Okamoto T. Gen-phos implant in surgical cavities performed in the tibia of rats submitted to experimental chronic alcoholism. A microscopic study. *Rev FOB*. 2002;10(1):17-22.
- Canova GC et al. Analysis of conventional and digital (Digora) radiographic methods for identification of the mineralized barrier after pulpotomy in dogs. *Cienc Odontol Bras*. 2003;6(4):1-8.
- Chen H et al. Effects of ethanol on the ultrastructure of the hamster femur. *Histol Histopathol*. 2001;16: 763-70.
- Cook WD An investigation of the radiopacity of composite restorative materials. *Aust Dental J*. 1981;26:105-12.
- Dai J et al. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J Clinical Investigation*. 2000; 106(7):887-95.
- Gürdal P, Akdeniz BG. Comparison of two methods for radiometric evaluation of resin-based restorative materials. *Dentomaxillofac Radiology*. 1998;27(4): 236-9.
- Keiver K, Weinberg J. Effect of duration of alcohol consumption on calcium and bone metabolism during pregnancy in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27(9):1507-19.
- Licks R, Damascena RM, Silveira ID, Costa NP. Comparação dos níveis de cinza de resinas compostas de alta viscosidade por meio de imagens radiográficas digitalizadas. *Rev Odonto Ciência*. 2004;19(43):25-31.
- Louzada MJQ, Pelá CA, Belangero WD, Santos-Pinto R. Avaliação da densidade óssea em imagens radiográficas: estudo em peças ósseas de cães. *Rev Bras Eng/Caderno de Eng Biom*. 1998a;14(1):47-64.
- Louzada MJQ, Pelá CA, Belangero WD, Santos-Pinto R. Metodologia para avaliação de densidade em imagens radiográficas. *Rev Bras Eng/Caderno de Eng Biom*. 1998b;14(2):37-47.
- Meurer MI, Meurer E, Yurgel LS, Costa NP. Análise da densidade óssea em região parassinfisária de mandíbulas humanas: comparação entre níveis de cinza em radiografias digitais (Sistema Digora) e unidades Hounsfield. *Rev Odonto Ciência*. 2003; 18(40):179-86.
- Nishiguchi S, et al. Effect of ethanol on bone mineral density of rats evaluated by dual-photon X-ray absorptiometry. *Journal of Bone Mineral Metabolism*. 2000;18:317-20.
- Nyquist F, Düppe H, Obrant KJ, Bondeson L, Nordsletten L. Effects of alcohol on bone mineral and mechanical properties of bone in male rats. *Alcohol and Alcoholism*. 2002;37(1):21-4.
- Oliveira EL, Luis MAV. Distúrbios relacionados ao álcool em um setor de urgências psiquiátricas. Ribeirão Preto, Brasil (1988-1990). *Caderno de Saúde Pública*. 1996;12(2).
- Oliveira-Filho AB, Salzedas LMP, Louzada MJQ. Densidade radiográfica em milímetros de alumínio no sistema digital direto. *Metodologia. Pesquisa Odontológica Brasileira*. 2003;17(supl. 1):53.
- Oliveira-Filho AB, Salzedas LMP, Louzada MJQ, Sundefeld MLMM. Avaliação da densidade radiográfica de materiais restauradores utilizando imagem digital. *Brazilian Oral Research*. 2004;18(supl. 1):107.
- Pereira BR, Souza PHC, Westphalen FH. Estudos dos níveis de cinza da densidade óssea mandibular mediante radiografias convencionais digitalizadas. *Rev Odonto Ciência*. 2004;19(44):176-9.
- Prévost AP, Forest D, Tanguay R, DeGrandmont P. Radiopacity of glass ionomer dental materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990;70(2):231-5.
- Tirapelli LF, Tirapelli DPC, Schimming BC. Ultrastructural alterations of the Parotid Glands of Rats (*Rattus norvegicus*) Submitted to Experimental Chronic Alcoholism. *Revista Chilena de Anatomia*. 2001;19(2).
- Vulcano LC, Ciarlini LDRP, Louzada MJQ, Caldas ELC. Valores normais da densidade óssea do carpo ulnar em potros em crescimento da raça Quarto de Milha através da densidade óptica radiográfica. *Hora Veterinária*. 1997;17(100):52-4.
- Willians JA, Billington RW. A new technique for measuring the radiopacity of natural tooth substance restorative materials. *J Oral Rehabilitation*. 1987; 14:267-9.
- www. [Acessado em 20 mar. 2004]. Disponível em <http://www.alcoolismo.com.br>
- Zecchin KG, Pereira MC, Graner E, Jorge Junior J. Conventional x-ray densitometry detects osteopenia in ovariectomized young rats. *Short communication. Braz J Oral Sci*. 2004;3(8):425-7.

Recebido para publicação em: 22/06/2006; aceito em: 08/11/2006.

Endereço para correspondência:

LEDA MARIA PESPINI SALZEDAS
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça – Cx. Postal 341
CEP 16015-050, Araçatuba, SP, Brasil
Fone: (18) 620-3310 ramal 3310