



Acta Ortopédica Brasileira

ISSN: 1413-7852

1atha@uol.com.br

Sociedade Brasileira de Ortopedia e
Traumatologia
Brasil

Oliveira Horvath, Renato de; Silva, Thiago Donizeth da; Calil Neto, Jamil; Romero
Nakagaki, Wilson; Dias Garcia, José Antonio; Soares, Evelise Aline
EFEITOS DO ALCOOLISMO E DA DESINTOXICAÇÃO ALCOÓLICA SOBRE O
REPARO E BIOMECÂNICA ÓSSEA

Acta Ortopédica Brasileira, vol. 19, núm. 5, 2011, pp. 305-308
Sociedade Brasileira de Ortopedia e Traumatologia
São Paulo, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=65721019008>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

EFEITOS DO ALCOOLISMO E DA DESINTOXICAÇÃO ALCOÓLICA SOBRE O REPARO E BIOMECÂNICA ÓSSEA

EFFECTS OF ALCOHOLISM AND ALCOHOLIC DETOXICATION ON THE REPAIR AND BIOMECHANICS OF BONE

RENATO DE OLIVEIRA HORVATH¹, THIAGO DONIZETH DA SILVA¹, JAMIL CALIL NETO¹, WILSON ROMERO NAKAGAKI², JOSÉ ANTONIO DIAS GARCIA¹, EVELISE ALINE SOARES¹.

RESUMO

Objetivo: Avaliar os efeitos do consumo crônico de etanol e da desintoxicação alcoólica sobre a resistência mecânica do osso e neoformação óssea junto a implantes de hidroxiapatita densa (HAD) realizados em ratos. **Métodos:** Foram utilizados 15 ratos divididos em três grupos, sendo controle (CT), alcoolista crônico (AC) e desintoxicado (DE). Após quatro semanas, foi realizada implantação de HAD na tíbia e produzida falha no osso parietal, em seguida o grupo AC continuaram a consumir etanol e o grupo DE iniciaram a desintoxicação. Ao completar 13 semanas os animais sofreram eutanásia, os ossos foram coletados para o processamento histomorfométrico e os fêmures encaminhados ao teste mecânico de resistência. **Resultados:** Os animais do grupo AC apresentaram menores valores de neoformação óssea, de calcemia e resistência mecânica, quando comparado aos grupos CT e DE. Os animais dos grupos DE apresentaram valores superiores em todas as variáveis avaliadas em relação ao grupo AC. **Conclusão:** O consumo de etanol interferiu na osteogênese ao redor de implante de HAD, nos níveis de cálcio e na resistência mecânica óssea. A desintoxicação alcoólica se mostrou eficaz, pois aumentou à osteogênese e osseointegração da HAD, a calcemia e resistência mecânica óssea. **Nível de Evidência I, estudo terapêutico.**

Descritores: Etanol. Alcoolismo. Hidroxiapatita. Biomecânica.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effects of chronic ethanol consumption and alcohol detoxication on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around dense hydroxyapatite implants (DHA) in rats. **Methods:** Fifteen rats were separated into three groups: (1) control group (CT); (2) chronic alcoholic (CA), and (3) disintoxicated (DI). After four weeks, a DHA was implanted in the right tibia of the animals, and the CA group continued consuming ethanol, while the DI group started detoxication. The solid and liquid feeding of the animals was recorded, and a new alcohol dilution was effected every 48 hours. After 13 weeks, the animals were euthanized and their biological material was collected. **Results:** Bone tissue was found around DHA in all the animals. Group CA showed less bone neoformation, lower levels of ionic and total calcium when compared to the animals of the CT and DI groups. The DI animals showed higher values in all the variables in relation to the CA group. **Conclusion:** Ethanol consumption interfered in osteogenesis around the DHA implants, and in calcium levels and mechanical bone resistance. Alcohol detoxication was effective, as it increased osteogenesis, DHA osteointegration, calcemia, and mechanical resistance of the bone. **Level of Evidence: Level I, therapeutic studies**

Keywords: Ethanol. Alcoholism. Hydroxyapatite. Biomechanics.

Citação: Horvath RO, Silva TD, Calil Neto J, Nakagaki WR, Dias GJA, Soares EA. Efeitos do alcoolismo e da desintoxicação alcoólica sobre o reparo e biomecânica óssea. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2011;19(5):305-8. Disponível em URL: <http://www.scielo.br/aob>.

Citation: Horvath RO, Silva TD, Calil Neto J, Nakagaki WR, Dias GJA, Soares EA. Effects of alcoholism and alcoholic detoxication on the repair and biomechanics of bone. *Acta Ortop Bras.* [online]. 2011;19(5):305-8. Available from URL: <http://www.scielo.br/aob>.

INTRODUÇÃO

Os ossos são estruturas rígidas fundamentais na sustentação do corpo. Porém, estão sujeitos a perdas ósseas decorrentes de fraturas, malformações ou ressecção de tumores. Embora apresentem capacidade de regeneração espontânea, grandes perdas ósseas necessitam de intervenções, tais como enxertos ósseos e implantes de biomateriais.¹ Na busca de materiais biocompatíveis, osteocondutores e que não promovam reações de imunogenicidade

surgiu a Hidroxiapatita (HA)², trata-se de uma biocerâmica similar ao osso, exibe forte estabilidade química, sendo amplamente utilizada pela odontologia e ortopedia.³ Pode ser produzida na forma de pó ou blocos, densos (HAD) ou porosos (HAP), com diferentes granulações e associada a diversos materiais como o colágeno, matriz óssea desmineralizada e proteínas osteoindutoras.^{4,5}

O alcoolismo é uma doença crônica que afeta 13% da população mundial,⁶ causando desordens psíquicas, orgânicas e socioeconômicas.⁷ O etanol, principal componente das bebidas alcoólicas,

Todos os autores declaram não haver nenhum potencial conflito de interesses referente a este artigo.

1- Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS - Alfenas, MG, Brasil.

2- Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP - Campinas, Brasil.

Trabalho desenvolvido na Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas MG e no Departamento de Biologia Celular e Estrutural da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
Correspondência: Evelise Aline Soares. Rua: Gentil Pereira Dias, 240 - Jardim Aeroporto, Alfenas, MG, Brasil - CEP 37130-000.
Email: evelise.soares@unifenas.br / eveanatomia@hotmail.com

Recebido em 13/07/10 aprovado em 10/07/2010.

age como elemento tóxico a órgãos vitais, atuando nocivamente mesmo em tecidos resistentes como os ossos.⁴ Friday e Howard⁸ mostraram que o etanol reduziu a proliferação celular, a síntese protéica e a atividade da fosfatase alcalina em células ósseas humanas "in vitro". Além disso, pacientes alcoolistas apresentaram predisposição a fraturas, a osteopenia e a alterações na regeneração óssea.⁹ Estudos histomorfométricos em ratos jovens sob ingestão crônica de etanol evidenciaram uma redução na velocidade de formação óssea a partir do endóstio e perióstio, além do comprometimento das propriedades mecânicas do osso.¹⁰ Diferentes metodologias têm sido utilizadas para avaliar os efeitos do álcool sobre o tecido ósseo. Camilli et al.¹¹ usaram etanol a 20% por quatro semanas até a implantação subperiosteal de Hidroxiapatita porosa (HAP) na tíbia e crânio de ratos, mantendo o tratamento até completar 140 dias de experimentação. Concluíram que a velocidade da osteogênese e o volume neoformado dos ratos tratados com álcool eram inferiores aos dos não tratados. Soares et al.⁴ ofereceu os ratos dieta líquida com etanol (10%) associado a doses diárias de nicotina (0,125 mg/100 do animal) administrada por via subcutânea por um período de 90 dias, constatando que o nível de cálcio sanguíneo, a resistência mecânica óssea e a neoformação óssea ao redor de implantes de HAD e HAP apresentou-se reduzida em relação ao grupo controle. O profissional deve estar atento aos hábitos do paciente, tais como o etilismo, tabagismo e o consumo de outras drogas que possam interferir na osseointegração e no reparo ósseo após fraturas. Considerando o grande número de indivíduos alcoolistas e a escassez de estudos referentes aos efeitos da desintoxicação alcoólica, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do etanol (15%) e da desintoxicação alcoólica sobre a neoformação óssea e sob a propriedade estrutural do osso.

MATERIAL E MÉTODOS

Protocolo Animal

Após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Protocolo nº 19A/2007, realizou-se este estudo no Laboratório de Fitofármacos da UNIFENAS, respeitando-se a Legislação Brasileira de Animais de Experimentação, regulamentada pela Lei Federal 6.638 (1979). Todo o experimento obedeceu aos princípios éticos em experimentação animal, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Foram utilizados 15 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, com 40 dias de idade, pesando $180 \pm 2,5$ g, mantidos no biotério da pós-graduação da UNIFENAS com controle de temperatura e controle de 12 horas no ciclo claro/escuro. Divididos em três grupos aleatórios (n=5): Grupo Controle (CT): Os animais receberam água *ad libitum*; Grupo Alcoolizado (AC): Esses animais seguiram o modelo de alcoolismo crônico determinado de "semi-voluntário", sendo o álcool o único alimento líquido disponível. Os animais passaram primeiramente por um breve período de adaptação gradativo ao álcool, recebendo, por duas semanas, dieta líquida à base de álcool etílico a 5% e 10% e na terceira semana álcool etílico a 15%, permanecendo com essa dieta até a décima terceira semana, seguindo protocolo proposto por Cagnon et al.¹² Grupo Desintoxicado (DE): Este grupo foi submetido ao mesmo protocolo que o grupo AC, no entanto, ao completar a quarta semana de ingestão de etanol 15% os animais iniciaram o período de desadaptação gradativa ao álcool, recebendo dieta líquida à base de álcool etílico a 10% e a 5%, por uma semana cada e uma dieta líquida à base de água *ad libitum* até a décima terceira semana, sendo, considerados como desintoxicados.

Todos os animais receberam a mesma dieta sólida (Nuvilab®) e a cada 48 horas, ao longo do experimento foram realizadas trocas da água, novas diluições do etanol, pesagem dos animais e mensuração do consumo sólido e líquido para calcular a ingestão média.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados com solução 1:1 de Ketamina (Francotar®) e Cloridrato de Xilazina (Virbaxyl® 2%) na dose de 0,10 ml/100g IM após seis semanas de experimentação.¹¹ Tricotomia e incisão longitudinal na pele da calota craniana e da perna esquerda foram realizadas, o perióstio foi afastado, expondo a cortical óssea. Foi produzido no osso parietal esquerdo uma cavidade de 5 mm com auxílio de um *Punch* trepano, a falha foi mantida aberta para a verificação do osso neoformado. Na epífise proximal da tíbia esquerda foi realizada outra falha de 3mm e implantada a biocerâmica hidroxiapatita densa (HAD). O perióstio no parietal e tíbia foi reposicionado através da sutura de suas bordas com fio de seda 8.0, e a pele foi suturada com fio de algodão 4.0. A biocerâmica HAD foi produzida pelo Instituto de Química da Unicamp, apresentando 3 mm de diâmetro e 3mm de comprimento. Todos os animais foram tratados com analgésico (dipirona sódica 500 mg/mL) adicionado à água (*ad libitum*) na dose de 875 mg/kg. Durante os 2 primeiros dias do pós-operatório e após 24 horas de cirurgia os animais deambulavam sem limitações significantes. Ao completar 13 semanas de experimento os animais foram anestesiados para coleta de sangue através da punção cardíaca⁴, em seguida os animais sofreram eutanásia através de overdose anestésica, por via intraperitoneal (IP), utilizando-se xilazina/ketamina (Francotar®, Virbaxyl® 2%) na concentração de 6 - 40 mg/Kg, respectivamente.

Teste Mecânico dos Fêmures

Para a realização do teste mecânico, os fêmures esquerdo dos animais foram coletados, limpos e acondicionados em gaze embebida em solução fisiológica (0,9%) e armazenados em freezer (-20°C) até o dia anterior ao ensaio.⁴ Os fêmures foram submetidos a teste mecânico de resistência no Laboratório de Propriedades Mecânicas da Faculdade de Engenharia Mecânica (FEM) da Unicamp. O ensaio mecânico foi realizado em um módulo de flexão de três pontos, *MTS TestStar II*, utilizando um célula de carga de 100 Kgf, a uma velocidade de 1,3 mm/min. A distância entre as duas extremidades ósseas foi de 50 mm, e, para se obter o valor da resistência, uma carga foi aplicada no terço médio do osso (diáfise) por meio de uma ponta, acoplada em uma máquina de ensaio universal.⁴ A força máxima necessária para a ruptura completa dos fêmures foi obtida após uma célula de carga registrada pelo Módulo de Flexão MTS em Newton (N).

Processamento Histomorfométrico

O osso parietal esquerdo e a tíbia esquerda, depois de coletados, foram fixados em formalina tamponada a 10% por 48 horas e descalcificados em solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio durante 15 dias. Em seguida, os ossos foram reduzidos e incluídos em parafina para cortes histológicos. Foram realizados cortes transversais semissecionados com 6 micrômetros de espessura, depositados em lâminas. Em seguida foram corados com hematoxilina/eosina (HE) para análise morfológica.⁴

O volume de osso neoformado foi obtido com o auxílio de um retículo quadrilátero de 100 pontos acoplado à ocular do microscópio. Após a contagem dos pontos, foi utilizada a fórmula $V_v = P_p/P_t$ (%), onde V_v = densidade de volume ou volume relativo; P_p = quantidade de pontos sobre o osso neoformado; P_t = número total de pontos do sistema, de acordo com o princípio de Delesse proposto por Mandarim de Lacerda.¹³

Concentração plasmática do cálcio

O sangue dos animais foi coletado e o soro obtido e centrifugado a 3.000 rpm e para a determinação o cálcio, seguindo o método proposto pela Labtest-Diagnóstica (Brasil), no qual se utiliza um reagente aquoso estabilizado. O método colorimétrico foi usado para determinar o cálcio total. Medido em espectrofotômetro (Gehaka G3410, Brasil) a 570 nm da cor produzida pelo complexo formado entre ortocresoftaleína complexona e o cálcio, em pH alcalino.¹³

Análise Estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste Tukey foi utilizada para comparar as médias entre diferentes grupos. Consideramos as diferenças significativas quando o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

O consumo líquido e sólido foi satisfatório entre os grupos, porém os animais do grupo AC e DE ingeriram menor quantidade de dieta líquida quando comparados com os animais dos grupos CT. (Tabela 1) O consumo de dieta sólida foi menor nos animais do grupo DE quando comparados com os animais dos grupos CT e AC. (Tabela 1) Durante o experimento os animais ganharam peso, e não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais. (Tabela 1)

Os resultados morfométricos demonstraram que os animais do grupo AC e DE apresentaram menor volume de osso neoformado ao redor dos implantes de HAD em relação ao grupo CT, sendo os animais do grupo AC os que menos osseointegraram a HAD. (Figura 1 e Tabela 1) Na falha óssea realizada no osso parietal também foi observado menor volume de osso neoformado nos animais do grupo AC. (Figura 2 e Tabela 1)

A força máxima (N) necessária para romper os fêmures dos animais do grupo AC foi inferior e estatisticamente diferente da força utilizada para romper os fêmures dos animais do grupo CT e DE. (Tabela 1) O deslocamento na força máxima foi igual entre os três grupos experimentais. (Tabela 1)

Os níveis plasmáticos de cálcio total dos animais do grupo AC foram inferiores e estatisticamente diferentes dos achados dos grupos CT e DE. (Tabela 1) Os níveis de cálcio iônico dos animais do grupo AC e DE apresentaram valores menores e estatisticamente diferentes do grupo CT. (Tabela 1)

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o etanol a 15% diminuiu a osteogênese ao redor dos implantes osseointegráveis de HAD, enquanto que a desintoxicação alcoólica auxilia a neoformação óssea e o consumo de dieta líquida e sólida dos animais frente ao consumo crônico de etanol não caracterizou desnutrição protéica ou desidratação. Assim, a limitação no processo de osteogênese nos animais dos grupos AC e DE são atribuídos apenas aos efeitos químicos do etanol.

Diferentes metodologias, com as variáveis, concentrações alcoólicas e tempo de exposição ao etanol são utilizadas para avaliar os efeitos do etanol no tecido ósseo e na sua reparação. Estudos referentes ao alcoolismo experimental utilizaram concentrações de etanol que variam de 10 a 30% em períodos de quatro a doze semanas.^{4,11} Nestas condições foram evidenciadas alterações na reparação óssea no que se refere à migração, proliferação e diferenciação das células osteogênica em osteoblastos.¹⁴ O protocolo animal utilizado no presente estudo foi suficiente para ocasionar alterações ósseas nos animais, não caracterizando over-

Tabela 1. Comparação do ganho de peso (Δ); consumo de dieta líquida e sólida; Volume ósseo neoformado; Força máxima para ruptura do fêmur; concentração de cálcio iônico e total nos grupos controle (CT), alcoolista (AC) e desintoxicado (DE)

	CT	AC	DE
ΔP (g)	267 20 ^a	264 5,7 ^a	263 20 ^a
Líquida (mL)	45 1,5 ^a	36,2 2,0 ^b	38 0,5 ^b
Sólida (g)	49,4 2,1 ^a	40,5 7,6 ^a	38,4 1,0 ^b
Osso Neoformado (%) ao redor da HAD (tíbia)	40,2 0,5 ^a	32,6 0,5 ^b	36,4 0,9 ^c
Osso Neoformado (%) na falha óssea (parietal)	90 3,4 ^a	53 1,4 ^b	71 5,5 ^c
Força Máxima (N)	165 36,5 ^a	100 14 ^b	140,5 16,5 ^c
Deslocamento (mm)	0,58 0,35 ^a	0,52 0,35 ^a	0,55 0,31 ^a
Cálcio Total (mEq/L)	17,2 1,4 ^a	12,3 1,3 ^b	17,7 1,2 ^c
Cálcio Iônico (mmol/L)	1,1 0,05 ^a	1,2 0,06 ^b	0,7 0,02 ^c

Dois médias, seguidas pela mesma letra pequena não são diferentes entre si ($P > 0,05$) ao teste de Tukey. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão.

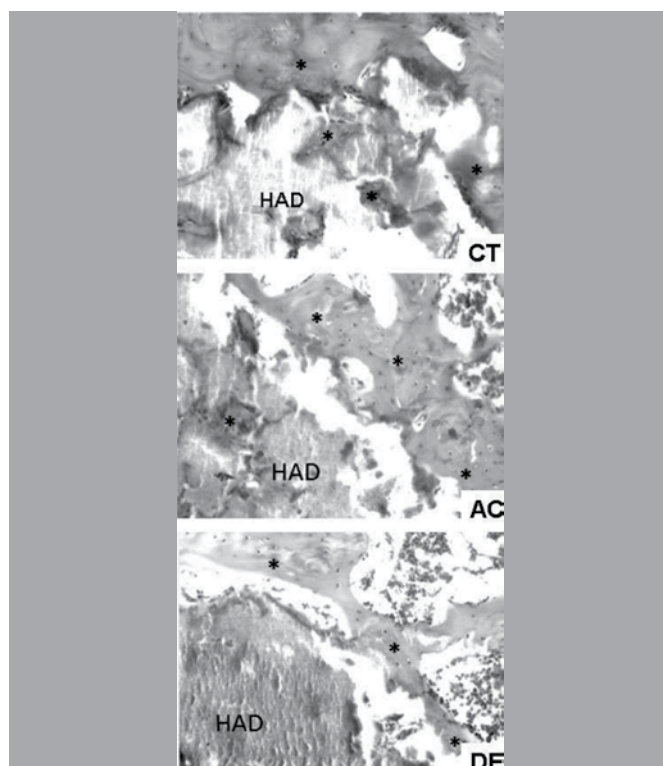


Figura 1. Fotomicrografia de corte transversal da tíbia do grupo CT, AC e DE. O osso neoformado (*) ao redor do implante de HAD realizado nas tíbias esquerdas dos animais (115x – H.E.).

dose e nem induzindo a morte dos animais. Na literatura científica pouca menção é feita relacionando aos efeitos da desintoxicação alcoólica e o reparo ósseo. No entanto na prática clínica muitas vezes é recomendado que o paciente evite o consumo de etanol no período pós-operatório.

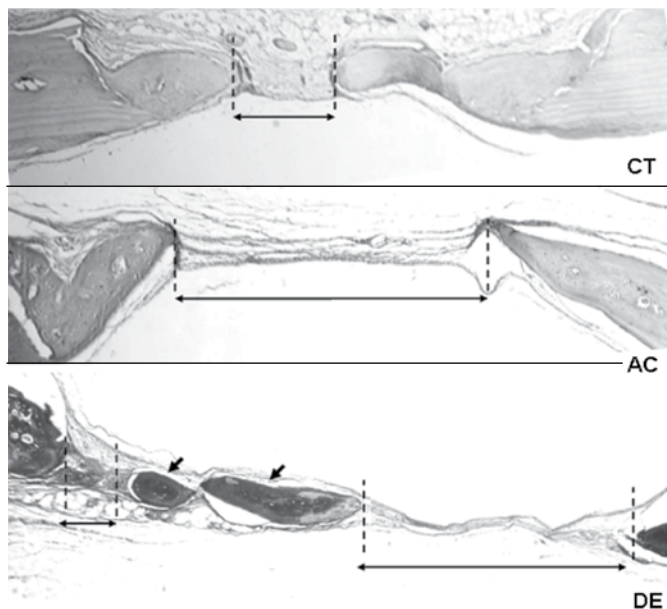


Figura 2. Fotomicrografia frontal do osso parietal exibindo menor neoformação na falha óssea (↔) dos animais do grupo AC e DE em comparação com os do grupo CT. Observar em DE a formação óssea intermediária no centro da falha (↓) (200x – H.E.).

Os animais do grupo AC consumiram menor quantidade de ração e água em relação aos animais CT e DE. Porém, os consumos diários foram superiores a 25g de ração e de 15 mL de água por dia, não caracterizando desnutrição e desidratação.^{4,15} O controle da ingesta líquida e sólida durante o experimento foi fundamental, pois uma baixa ingesta sólida pode ocasionar desnutrição protéica e a pequena ingesta líquida uma desidratação, influenciando de forma negativa nos resultados.¹⁶

O consumo do etanol diminuiu a osteogênese ao redor dos im-

plantes de HAD nos animais AC e DE. Contudo a osseointegração da HAD foi observada em ratos alcoolistas, com menor volume ósseo Peri-implantar em relação aos animais não alcoolistas e desintoxicados. Embora o volume de osso neoformado nos animais desintoxicados foi inferior aos animais do grupo controle é possível notar que a eliminação do consumo de etanol tem efeito positivo no reparo ósseo. O etanol interfere no processo de cicatrização óssea limitando ou inviabilizando os implantes osseointegráveis, inibindo a proliferação celular e acelerando a apoptose osteoblástica em humanos,¹⁷ diminuindo os níveis de cálcio ionizado no sangue e prejudicando o processo de mineralização óssea.¹⁸ O consumo crônico do etanol induz a uma diminuição da calcemia.¹⁰ Os níveis de cálcio iônico e cálcio total dos animais do grupo AC foram inferiores aos valores observados nos animais do grupo CT e DE, já os níveis de calcemia dos animais do grupo DE mesmo sendo menores que do grupo CT, são superiores aos dos animais do grupo AC, demonstrando que a desintoxicação alcoólica permite melhoras nos níveis de cálcio sanguíneo.

O etanol altera a composição mineral e as propriedades mecânicas dos ossos, tornando-os mais frágeis e propensos a fraturas.⁴ Os testes mecânicos dos fêmures realizados evidenciam a fragilidade óssea dos fêmures dos animais do grupo AC, uma vez que estes foram quebrados com menor força quando comparado aos animais do grupo CT e DE. Os animais desintoxicados mesmos necessitando de uma força menor para quebrar, que os animais CT ainda demonstram maior resistência óssea do que os animais alcoolistas crônicos.

CONCLUSÃO

O consumo de etanol na concentração de 15% interferiu negativamente na osteogênese ao redor de implante de HAD, nos níveis de cálcio e na resistência mecânica óssea. A desintoxicação alcoólica demonstrou-se eficaz, pois aumentou a osteogênese e osseointegração da HAD, a calcemia e resistência mecânica óssea.

REFERÊNCIAS

- Caria PH, Kawachi EY, Bertran CA, Camilli JA. Biological assessment of porous-implant hydroxyapatite combined with periosteal grafting in maxillary defects. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65:847-54.
- Legeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin. Orthop. Rel. Res.* 2002;395:81-98.
- Vidigal GM, Goisman M. Osseointegração x biointegração: uma análise crítica. *Rev Bras Odontol.* 2003;4:54-6.
- Soares EA, Favaro WJ, Cagnon VHA, Bertran CA, Camilli, JA. Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. *J Bone Miner Metab.* 2010;28:101-7.
- Moreira ASB, Pastorelli MT, Damasceno LHF, Defino HLA. Estudo experimental da influência das dimensões dos grânulos de hidroxiapatita na integração óssea. *Acta Ortop Bras.* 2003;11:240-50.
- Cruz LA. Alcoolismo. Disponível em: <http://www.alcoolismo.br>. Acesso em 18 de jun. 2009.
- Barros MBA, Botega NJ, Dalgalarondo P, Marín-León L, Oliveira HB. Prevalence of alcohol abuse and associated factors in a population-based study. *Rev Saúde Pública.* 2007;41:502-9.
- Friday KE, Howard GA. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. *Metabolism.* 1991;40:562-5.
- Klein RF. Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996;20:572-8.
- Peng TC, Lian JB, Hirsch PF, Kusy RP. Lower serum osteocalcin in ethanol-fed rats. *J Bone Miner Res.* 1991;6:107-15.
- Camilli JA, Cunha MR, Bertran CA, Kawachi EY. Speriosteal hydroxyapatite implants in rats submitted to ethanol ingestion. *Arch Oral Biol.* 2004;44:747-53.
- Cagnon VM, Garcia PJ, Martinez FE, Martinez M, Padovani CR. Ultrastructural study of the ventral lobe of the prostate of rats submitted to experimental chronic alcoholism. *Prostate.* 1993;22:317-24.
- Mandarin de Lacerda CA. What is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The example of the stereology. *Braz J Morphol.* 1999;16:131-9.
- 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 Alcohol.* 2002;37:21-4.
- Svendsen P, Hau J. Handbook of laboratory animal science. London: CRC Press; 1984.
- Holbrook TL, Connor EB. A prospective study of alcohol consumption and bone mineral density. *BMJ.* 1993;306:1506-9.
- Diez A, Serrano S, Cucurull J, Marinosa LL, Bosh J, Prug J. Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-Dawley rats. *Calcif Tissue Int.* 1997;61:168-71.
- Keiver K, Duggal S, Simpson M.E. Ethanol administration results in a prolonged decrease in blood ionized calcium levels in the rat. *Alcohol.* 2005;37:173-8.