

## **EFEITO DO CONSUMO DE ETANOL DURANTE A GESTAÇÃO NA PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR DE OSTEOBLASTOS DE RATOS RECÉM-NASCIDOS**

**Carvalho, I. C. S., Andrade, D. P., Santos, E. L. S., Oliveira, L. D., Vasconcellos, L. M. R., Rocha, R. F.**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP/Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal; Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777 – Jardim São Dimas, São José dos Campos – SP; isabel\_chaves@zipmail.com.br

**Resumo-** O álcool atua no organismo provocando várias patologias importantes, além de atuar nas células ósseas podendo causar um efeito antiproliferativo. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do consumo crônico de álcool na proliferação e viabilidade celular de osteoblastos obtidos da calvária de recém-nascidos de ratas submetidas ao consumo crônico de etanol a 20% durante a gestação. Foram utilizadas 18 ratas prenhas, divididas em grupos conforme a dieta: grupo álcool a 20%, grupo isocalórico, grupo controle e tratadas durante a gestação. Aos três dias de vida, os recém-nascidos foram eutanasiados para remoção das calvárias e isolamento das células por meio de digestão enzimática sequencial, sendo estas cultivadas por períodos de até 10 dias. Foram realizados testes para avaliar a proliferação e viabilidade celular. Os resultados mostraram que o grupo álcool apresentou aumento significativo na proliferação, exceto no período de 1 dia. Com relação à viabilidade celular, apenas no período de 3 dias houve aumento significativo de células no grupo álcool. Concluímos que o álcool não interferiu negativamente na proliferação e viabilidade dos osteoblastos, talvez pelo curto tempo de administração.

**Palavras-chave:** Álcool etílico. Gestação. Proliferação celular. Viabilidade celular.

**Área do Conhecimento:** Farmacologia

### **Introdução**

Nos últimos anos o consumo de álcool e seus efeitos tem sido grande objeto de estudo e a compreensão sobre seus efeitos tem avançado substancialmente, assim como a prevenção e o tratamento. O consumo crônico excessivo de álcool pode resultar em osteopenia e aumentar o risco de osteoporose (CHAKKALAKAL, 2005). Segundo Daí et al. (2000) os efeitos diretos do álcool sobre as células responsáveis pela remodelação óssea, e consequente osteopenia, implicam em um déficit da deposição óssea dependente de osteoblasto e/ou por um excesso de reabsorção óssea dependente de osteoclasto.

Os efeitos do etanol sobre o tecido ósseo têm sido avaliados através de várias técnicas como biomecânica, histomorfológica, molecular e quantificação mineral. Esses estudos têm demonstrado que o etanol inibe o crescimento ósseo (SAMPSON et al., 1997), reduz a densidade mineral óssea (TURNER, 2000) e a resistência óssea (HOGAN et al., 2001).

Dyer et al. (1998) em estudo *in vivo* com roedores mostraram que o consumo de etanol reduziu a proliferação de osteoblastos. Adicionalmente, outros estudos *in vitro* demonstraram redução na função e no número de osteoblastos. Chavassieux et al. (1993) e Friday e Howard (1991) verificaram em seus estudos que o

etanol inibe a proliferação e a diferenciação de células osteogênicas obtidas de fragmentos de ossos humanos. Klein et al. (1996) também verificaram diminuição na proliferação de células osteoblásticas de osteossarcoma.

Além disso, o etanol consumido durante a gestação tem efeito teratogênico, como a Síndrome Alcoólica Fetal, uma das graves consequências causadas pela exposição do álcool durante a gestação, provocando distúrbios físicos, crescimento intra-uterino atrasado e deficiência intelectual pós-natal (RIFAS et al., 1997, LONG et al., 2010). Outro efeito importante é também quanto ao desenvolvimento ósseo (RAMADOSS et al., 2006). O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do consumo crônico de álcool na proliferação e viabilidade celular de osteoblastos obtidos da calvária de recém-nascidos de ratas submetidas ao consumo crônico de etanol a 20% durante a gestação.

### **Metodologia**

Dezoito ratas Wistar prenhas (300 g) foram divididas em grupos conforme a dieta e tratadas durante a gestação. Os animais do grupo álcool receberam solução alcoólica a 20% e ração à vontade. O grupo controle nutricional isocalórico recebeu a mesma quantidade de solução de sacarose que o grupo álcool ingeriu de solução

alcoólica na véspera, além de água à vontade e ração com quantidade média ingerida de véspera pelo grupo álcool. Os animais do grupo controle receberam água e ração à vontade.

Para a coleta da calvária os filhotes foram eutanasiados aos três dias de vida por decapitação e as células osteogênicas foram isoladas por digestão enzimática sequencial dos fragmentos de calvária. A digestão enzimática foi realizada utilizando solução de tripsina a 0,25% (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e colagenase tipo II a 0,1% (Gibco), como descrito previamente por Oliveira e Nanci (2004). As células foram plaqueadas em placas de poliestireno de 24 poços, na densidade de 20.000 células/poço. As células plaqueadas foram cultivadas por períodos de até 10 dias em Meio Essencial Mínimo, modificação alfa, com L-glutamina (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), 7mM de beta-glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma) e 50 µg/mL de gentamicina (Gibco), à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi trocado a cada três dias e a progressão da cultura foi avaliada por microscopia de fase invertida.

Para avaliação da proliferação celular as células foram cultivadas nos períodos de 1, 3, 7 e 10 dias após o isolamento celular. O meio de cultura foi removido dos poços e estes foram lavados três vezes com PBS (Gibco) a 37°C para remoção das células que não estavam aderidas. As células aderidas foram enzimaticamente removidas dos poços com a utilização de 1 mM de ácido etilenodiamino tetracético (EDTA, Gibco), tripsina 0,25% (Gibco) e 1,3 mg/mL de colagenase tipo II (Gibco). Em seguida as células foram coradas com azul de Trypan 0,4% (Gibco) e contadas em hemocítômetro (BELOTI et al., 2008). Os valores foram expressos em uma curva de crescimento celular em número de células por poço.

Para avaliação da viabilidade celular, as células foram cultivadas nos poços e avaliadas em três períodos: 3, 7 e 10 dias. A análise foi realizada pelo ensaio colorimétrico MTT [(brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolol] (Sigma), que corresponde a um sal que é reduzido pela proteinase succinato desidrogenase ativa apenas em células viáveis. Alíquotas de MTT a 5 mg/mL em PBS foram preparadas, procedendo-se em seguida à incubação das culturas primárias com esta solução a 10% em meio de cultura por 4 horas a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico. Após esse período, as culturas foram lavadas com 1 mL de PBS (Gibco) aquecido. Em seguida foi adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido (0,04 N

HCL em isopropanol) em cada poço sob agitação por 5 minutos, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 200 µL foram retiradas dos poços e transferidas para placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm com correção para 650 nm (ROSA et al., 2009). Os dados foram expressos em densidade óptica.

Os dados apresentados neste estudo são resultados representativos de três experimentos isolados de culturas celulares estabelecidas a partir de animais diferentes, com seis poços para todos os grupos testados para cada parâmetro avaliado.

Para comparar os resultados utilizou-se os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Friedman, com nível de significância definido de 5%.

## Resultados

A proliferação celular aumentou com o passar dos dias, independente do grupo avaliado (Tabela 1 e Figura 1).

Tabela 1- Média e ± desvio padrão da proliferação celular de osteoblastos em número de células x10<sup>4</sup> por poço entre os grupos em cada período

| Proliferação Celular      | 1 dia         | 3 dias         | 7 dias           | 10 dias          |
|---------------------------|---------------|----------------|------------------|------------------|
| Grupo Controle (n= 18)    | 1,92<br>±0,83 | 4,40<br>±2,45* | 27,29<br>±16,91* | 44,08<br>±7,51*  |
| Grupo Álcool (n= 18)      | 1,98<br>±1,51 | 8,95<br>±4,04* | 40,81<br>±9,93*  | 53,01<br>±7,81*  |
| Grupo Isocalórico (n= 18) | 1,75<br>±0,65 | 5,86<br>±1,52* | 34,63<br>±5,51*  | 50,65<br>±10,52* |
| p                         | 0,756         | 0,001          | 0,010            | 0,015            |

\*Diferença estatisticamente significativa

O teste de Friedman comparou a proliferação celular de cada grupo ao longo do tempo, sendo observada diferença estatisticamente significativa em todos os grupos (Tabela 2).

Comparando a proliferação celular nos diferentes grupos em cada período, pelo teste de Kruskal-Wallis, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos, exceto no período de 1 dia (Tabela 1 e Figura 1).

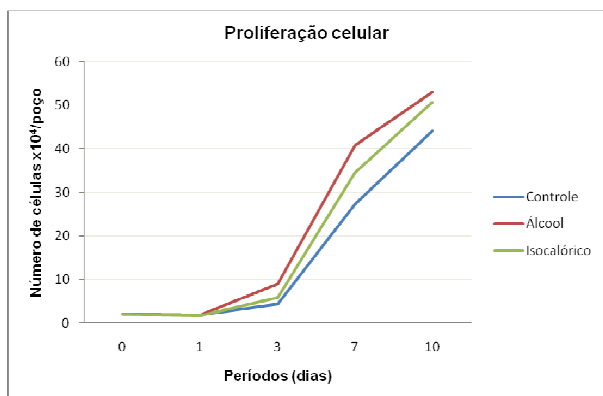


Figura 1- Gráfico representativo da proliferação celular de osteoblastos em número de células  $\times 10^4$  por poço de cada grupo nos vários períodos.

Tabela 2- Média e  $\pm$  desvio padrão da proliferação celular de osteoblastos em número de células  $\times 10^4$  por poço de cada grupo ao longo dos vários períodos

| Proliferação Celular   | Período | Média $\pm$ desvio padrão | p     |
|------------------------|---------|---------------------------|-------|
| Controle<br>(n= 18)    | 1 dia   | 1,92 $\pm$ 0,83*          | 0,001 |
|                        | 3 dias  | 4,40 $\pm$ 2,45*          |       |
|                        | 7 dias  | 27,29 $\pm$ 16,91*        |       |
|                        | 10 dias | 44,08 $\pm$ 7,51*         |       |
| Álcool<br>(n= 18)      | 1 dia   | 1,98 $\pm$ 1,51*          | 0,001 |
|                        | 3 dias  | 8,95 $\pm$ 4,04*          |       |
|                        | 7 dias  | 40,81 $\pm$ 9,93*         |       |
|                        | 10 dias | 53,01 $\pm$ 7,81*         |       |
| Isocalórico<br>(n= 18) | 1 dia   | 1,75 $\pm$ 0,65*          | 0,001 |
|                        | 3 dias  | 5,86 $\pm$ 1,52*          |       |
|                        | 7 dias  | 34,63 $\pm$ 5,51*         |       |
|                        | 10 dias | 50,65 $\pm$ 10,52*        |       |

\*Diferença estatisticamente significativa

A viabilidade celular aumentou gradualmente em todos os grupos ao longo dos vários períodos (Tabela 3 e Figura 2).

O teste de Friedman comparou a viabilidade de cada grupo ao longo do tempo, sendo observada diferença estatística significativa em todos os grupos (Tabela 4).

Comparando a viabilidade celular nos diferentes grupos em cada período, pelo teste de Kruskal-Wallis, verificou-se diferença estatística significativa apenas no período de 3 dias (Tabela 3 e Figura 2).

Tabela 3- Média e  $\pm$  desvio padrão da viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) entre os grupos em cada período

| Viabilidade Celular          | 3 dias             | 7 dias            | 10 dias           |
|------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| Grupo Controle<br>(n= 18)    | 0,322 $\pm$ 0,127* | 1,163 $\pm$ 0,200 | 1,563 $\pm$ 0,384 |
| Grupo Álcool<br>(n= 18)      | 0,551 $\pm$ 0,153* | 1,097 $\pm$ 0,185 | 1,643 $\pm$ 0,240 |
| Grupo Isocalórico<br>(n= 18) | 0,398 $\pm$ 0,057* | 1,048 $\pm$ 0,266 | 1,404 $\pm$ 0,393 |
| p                            | 0,001              | 0,263             | 0,203             |

\*Diferença estatisticamente significativa

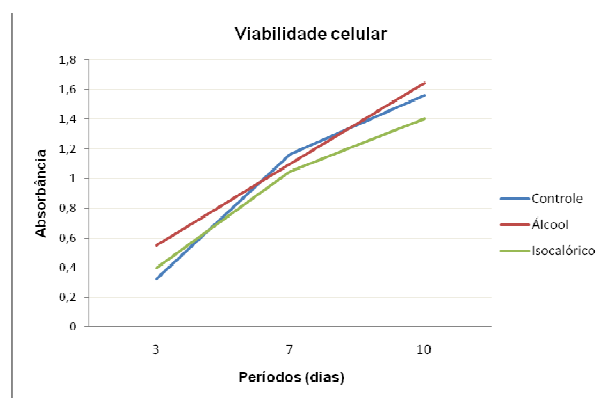


Figura 2- Gráfico representativo da viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) de cada grupo nos vários períodos.

Tabela 4- Média e  $\pm$  desvio padrão da viabilidade celular de osteoblastos em densidade óptica (570-650 nm) de cada grupo ao longo dos vários períodos

| Viabilidade celular    | Período | Média $\pm$ desvio padrão | p     |
|------------------------|---------|---------------------------|-------|
| Controle<br>(n= 18)    | 3 dias  | 0,322 $\pm$ 0,127*        | 0,001 |
|                        | 7 dias  | 1,163 $\pm$ 0,200*        |       |
|                        | 10 dias | 1,563 $\pm$ 0,384*        |       |
| Álcool<br>(n= 18)      | 3 dias  | 0,551 $\pm$ 0,153*        | 0,001 |
|                        | 7 dias  | 1,097 $\pm$ 0,185*        |       |
|                        | 10 dias | 1,643 $\pm$ 0,240*        |       |
| Isocalórico<br>(n= 18) | 3 dias  | 0,398 $\pm$ 0,057*        | 0,001 |
|                        | 7 dias  | 1,048 $\pm$ 0,266*        |       |
|                        | 10 dias | 1,404 $\pm$ 0,393*        |       |

\*Diferença estatisticamente significativa

## Discussão

O álcool é uma substância que, se consumida regularmente, pode causar alterações sobre a saúde do indivíduo que o consome, dependendo do tipo de bebida e da quantidade consumida. Segundo Micallef et al. (2007) o consumo de 400 mL por dia de vinho tinto, tipo carbenet sauvignon, aumenta a concentração de antioxidantes e proporciona ao indivíduo uma proteção no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Berg et al. (2008) também constataram que o consumo crônico de álcool de até um drinque por dia pode ter efeito benéfico para o tecido ósseo.

Em contrapartida, outros trabalhos demonstraram que o consumo crônico exagerado de bebida alcoólica pode estar associado com distúrbios do trato digestivo (LIEBER, 2003), câncer, particularmente das vias aéreas superiores e do trato digestivo (SEITZ; BECKER, 2007), entre outras patologias. Adicionalmente, estudos clínicos mostraram que o consumo crônico está associado com osteopenia e aumento do risco de fraturas (KLEIN, 1997).

O mecanismo da osteopenia associada ao álcool não está claramente elucidado, mas parece envolver um efeito direto do álcool sobre as células ósseas, que leva à supressão da formação de osso novo e/ou por um excesso de reabsorção óssea dependente da atividade do osteoclasto (DAÍ et al., 2000). Experimentos *in vitro* (FRIDAY; HOWARD, 1991; CHAVASSIEUX et al., 1993; KLEIN et al., 1996) utilizando culturas de células osteoblásticas e *in vivo* (DYER et al., 1998) indicaram que as reduções observadas na formação óssea resultam do efeito direto e antiproliferativo sobre o osteoblasto.

A sensibilidade das células ósseas aos efeitos nocivos do álcool pode ser ainda maior durante o seu desenvolvimento no útero (WEZEMAN et al., 1999), já que em gestantes o abuso crônico de bebidas alcoólicas pode conduzir à Síndrome Alcoólica Fetal e outros efeitos teratogênicos importantes no desenvolvimento do esqueleto (RIFAS et al., 1997, MIRANDA et al., 2010). Entretanto, os efeitos específicos do etanol no esqueleto ainda não estão bem estabelecidos devido à dificuldade em se distinguir o efeito no tecido ósseo e no metabolismo (TURNER, 2000). Assim, diversos trabalhos têm utilizado animais de laboratório para verificar os efeitos do álcool sobre o tecido ósseo (DYER et al., 1998; DAI et al., 2000; HOGAN et al., 2001; TORRICELLI et al., 2007; TORRICELLI et al., 2008; ROSA et al., 2008; CHEN et al., 2009; DECO et al., 2010).

No presente estudo a administração do álcool foi realizada via oral para ratas prenhas durante todo o período da gestação, sendo que não

encontramos na literatura trabalhos experimentais com a metodologia empregada. A dieta líquida oferecida às ratas durante a gestação foi na concentração de 20% de etanol, uma vez que esta concentração já foi utilizada em estudos prévios e demonstrou fornecer o aporte hídrico necessário para o animal e ser suficiente para promover alterações fisiológicas (SOUZA; ROCHA, 2009; SOUZA et al., 2009; DECO et al., 2010).

Estudos mostraram que a proliferação de osteoblastos pode ser influenciada pelo consumo crônico de álcool (DYER et al., 1998; TORRICELLI et al., 2007). Em nosso estudo a proliferação dos osteoblastos aumentou ao longo do tempo, em todos os grupos avaliados, demonstrando a progressão da cultura celular. Entretanto, o grupo álcool obteve sempre a maior média em número de células proliferadas. Este resultado está de acordo com o estudo de Rosa et al., (2008), que após remover células do fêmur de ratos, previamente submetidos à ingestão crônica de álcool, verificaram também que o consumo de etanol promoveu efeito estimulador às células, quando não exposto em contato direto com a cultura celular. Segundo estes autores as diferenças nos valores da proliferação celular, observadas entre os vários estudos podem ser atribuídas a fontes de células diferentes. Por outro lado, nossos resultados divergem dos obtidos por Friday e Howard (1991), Chavassieux et al. (1993) e Klein et al. (1996), que mostraram efeito antiproliferativo do álcool sobre as células osteoblásticas. Todavia esses trabalhos avaliaram os efeitos do álcool *in vitro* com adição direta do etanol ao meio de cultura oferecido aos diferentes tipos de células osteoblásticas, diferentemente do nosso estudo que avaliou o efeito do etanol sistemicamente. Outro aspecto importante a ser levado em consideração é a metodologia empregada nos vários trabalhos, pois alguns autores utilizam o álcool no meio de cultura e outros somente sistemicamente.

Com relação à viabilidade celular, nossos resultados demonstraram um aumento gradual de células viáveis ao longo dos vários períodos, independente do grupo. Estes resultados indicam que o consumo de etanol na concentração utilizada apresentou baixos níveis de citotoxicidade. Comparando-se os grupos, notou-se diferença estatística apenas no período de 3 dias, em que o grupo álcool apresentou maior taxa de viabilidade. Essa diferença entre o grupo álcool em relação ao grupo isocalórico talvez possa ser explicada pela deficiência nutricional do grupo isocalórico, que pode ter alterado a capacidade da célula ser viável. No estudo de Rosa et al. (2008) a viabilidade das células que receberam ou não o etanol em seu meio de cultura foi em torno de 90%.



Segundo estes autores, a alta taxa de viabilidade demonstrou que o efeito inibitório do etanol sobre a formação óssea não foi provocado por toxicidade celular direta como sugerido por Maran et al., (2001). Por outro lado, Torricelli et al. (2008) verificaram diminuição da viabilidade celular e da atividade sintética dos osteoblastos expostos ao etanol quando cultivados em amostras puras de titânio.

Ao contrário da hipótese do presente estudo, os resultados sugerem que o consumo crônico de etanol durante a gestação não apresentou efeito antiproliferativo aos osteoblastos dos recém-nascidos. Contudo, estudos prévios que administraram o álcool por longo tempo em ratos adultos obtiveram resultados negativos deste no tecido ósseo (SOUZA, ROCHA, 2009; SOUZA et al., 2009; DECO et al., 2010). Portanto, se o consumo crônico de álcool estivesse sido administrado por longo tempo e previamente ao período de gestação, condicionando o animal ao alcoolismo, os resultados deste presente estudo poderiam ser diferentes. Além disso, os efeitos antiproliferativos do álcool sobre os osteoblastos, observados nos trabalhos prévios de Friday e Howard (1991), Chavassieux et al. (1993) e Klein et al. (1996) ocorreram provavelmente devido à administração direta do álcool sobre as células, diferente da metodologia utilizada em nosso estudo que foi por via sistêmica.

A partir dos resultados obtidos, trabalhos futuros devem elucidar se o condicionamento das ratas ao alcoolismo pode influenciar na resposta das células ósseas dos recém-nascidos. Vale ressaltar que o álcool para chegar aos osteoblastos dos fetos necessita de passagem placentária e talvez o tempo utilizado de 21 dias ou a dose do álcool não tenha sido suficiente. Portanto, os estudos nesta área devem ser ampliados para que se possam obter resultados mais conclusivos.

## Conclusão

Com base nos resultados obtidos conclui-se que o álcool não interferiu negativamente na proliferação e viabilidade dos osteoblastos obtidos da calvária de recém-nascidos de ratas submetidas ao consumo crônico de etanol a 20% durante a gestação.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPESP (2010/50338-0) e à CAPES pelo auxílio financeiro.

## Referências

- BELOTI, M.M.; MARTINS JÚNIOR, W.; XAVIER, S.P.; ROSA, A.L. In vitro osteogenesis induced by cells derived from sites submitted to sinus grafting with anorganic bovine bone. **Clin Oral Impl Res.** V.19, p.48-54, 2008.
- BERG, K.M.; KUNINS, H.V.; JACKSON, J.L.; NAHVI, S.; CHAUDHRY, A.; HARRIS, K.A.; et al. Association between alcohol consumption and both osteoporotic fracture and bone density. **Am J Med.** V.121, n.5, p.406-418, 2008.
- CHAKKALAKAL, D.A. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. **Alcohol Clin Exp Res.** V.29, n.12, p.2077-2090, 2005.
- CHAVASSIEUX, P.; SERRE, C.M.; VERGNAUD, P.; DELMAS, P.D.; MEUNIER, P.J. In vitro evaluation of dose-effects of ethanol on human osteoblastic cells. **Bone and Mineral.** V.22, p.95-103, 1993.
- CHEN, J.R.; LAZARENKO, O.P.; HALEY, R.L.; BLACKBURN, M.L.; BADGER, T.M.; RONIS, M.J. Ethanol impairs estrogen receptor signaling resulting in accelerated activation of senescence pathways, whereas estradiol attenuates the effects of ethanol in osteoblasts. **J Bone Miner Res.** V.24, n.2, p.221-230, 2009.
- 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.** V.106, n.7, p.887-895, 2000.
- DECO, C.P.; MARCHINI, A.M.P.S.; BÁRBARA, M.A.M.; VASCONCELLOS, L.M.R.; ROCHA, R.F.; MARCHINI, L. Negative effects of alcohol and estrogen deficiency combination on osseointegration in a rat model. **J Oral Implant.** V.10, p.10-15, 2010.
- DYER, A.S.; BUCKENDAHL, P.; SAMPSON, H.W. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. **Alcohol.** V.16, n.4, p.337-341, 1998.
- FRIDAY, K.E.; HOWARD, G.A. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. **Metabolism.** V.40, n.6, p.562-565, 1991.
- HOGAN, H.A.; ARGUETA, F.; MOE, L.; NGUYEN, L.P.; SAMPSON, W. Adult-onset alcohol consumption induces osteopenia in female rats. **Alcohol Clin Exp Res.** V.25, n.5, p.746-754, 2001.

- KLEIN, R.F.; FAUSTI, K.A.; CARLOS, A.S. Ethanol inhibits human osteoblastic cell proliferation. **Alcohol Clin Exp Res.** V.20, n.3, p.572-578, 1996.
- KLEIN, R.F. Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. **Alcohol Clin Exp Res.** V.21, n.3, p.392-399, 1997.
- LIEBER, C.S. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. **Alcohol Res Health.** V.27, n.3, p.220-231, 2003.
- LONG, L.; LI, Y.; WANG, Y.D.; HE, Q.Y.; LI, M.; CAI, X.D.; et al. The preventive effect of oral EGCG in a fetal alcohol spectrum disorder mouse model. **Alcohol Clin Exp Res.** V.34, n.11, p.1929-1936, 2010.
- MARAN, A.; ZHANG, M.; SPELSBERG, T.C.; TURNER, R.T. The dose-response effects of ethanol on the human fetal osteoblastic cell line. **J Bone Miner Res.** V.16, n.2, p.270-276, 2001.
- MICALLEF, M.; LEXIS, L.; LEWANDOWSKI, P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases oxidative stress in the circulation of both young and old humans. **Nutr J.** V.24, p. 6-27, 2007.
- MIRANDA, R.C.; PIETRZYKOWSKI, A.Z.; TANG, Y.; SATHYAN, P.; MAYFIELD, D.; KESHAVARZIAN, A.; et al. MicroRNAs: Master regulators of ethanol abuse and toxicity?. **Alcohol Clin Exp Res.** V.34, n.4, p.575-587, 2010.
- OLIVEIRA, P.T.; NANCI, A. Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells. **Biomaterials.** V.25, p.403-413, 2004.
- RAMADOSS, J.; HOGAN, H.A.; GIVEN, J.C.; WEST, J.R.; CUDD, T.A. Binge alcohol exposure during all tree trimesters alters bone strength and growth in fetal sheep. **Alcohol.** V.38, p185-192, 2006.
- RIFAS, L.; TOWLER, D.A.; AVIOLI, L.V. Gestational exposure to ethanol suppresses msx2 expression in developing mouse embryos. **Proc Natl Acad Sci.** V.94, p.7549-7554, 1997.
- ROSA, M.L.; BELOTI, M.M.; PRANDO, N.; QUEIROZ, R.H.C.; OLIVEIRA, P.T.; ROSA, A.L. Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. **J Appl Toxicol.** V.28, p.205-211, 2008.
- ROSA, A.L.; CRIPPA, G.E.; DE OLIVEIRA, P.T.; TABA JÚNIOR, M.; LEFEBVRE, L-P; BELOTI, M.M. Human alveolar bone cell proliferation, expression of osteoblastic phenotype, and matrix mineralization on porous titanium produced by powder metallurgy. **Clin Oral Imp Res.** V.20, p.472-481, 2009.
- SAMPSON, H.W.; CHAFFIN, C.; LANGE, J.; DEFEE, B. Alcohol consumption by young actively growing rats: a histomorphometric study of cancellous bone. **Alcohol Clin Exp Res.** V.21, p.352-359, 1997.
- SEITZ, H.K.; BECKER, P. Alcohol metabolism and cancer risk. **Alcohol Res Health.** V.30, n.1, p.38-47, 2007.
- SOUZA, D.M.; RICARDO, L.H.; KANTOSKI, K.Z.; ROCHA, R.F. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. **Braz Oral Res.** V.23, n.3, p.326-332, 2009.
- SOUZA, D.M.; ROCHA, R.F. Low caloric value of ethanol itself increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in male rats. **Braz Oral Res.** V.23, n.4, p.450-456, 2009.
- TORRICELLI, P.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; BORSARI, V.; RIMONDINI, L.; RIMONDINI, R.; et al. Intermittent exposure to ethanol vapor affects osteoblast behavior more severely than estrogen deficiency does in vitro study on rat osteoblasts. **Toxicology.** V.237, p.168-176, 2007.
- TORRICELLI, P.; FINI, M.; GIAVARESI, G.; RIMONDINI, L.; TSCHON, M.; RIMONDINI, R.; et al. Chronic alcohol abuse and endosseous implants: linkage of in vitro osteoblast dysfunction to titanium osseointegration rate. **Toxicology.** V.243, p.138-144, 2008.
- TURNER, R.T. Skeletal response to alcohol. **Alcohol Clin Exp Res.** V.24, n.11, p.1693-16701, 2000.
- WEZEMAN, F.H.; EMANUELE, M.A.; EMANUELE, N.V.; MOSKAL, S.F.; WOODS, M.; SURI, M.; et al. Chronic alcohol consumption during male rat adolescence impairs skeletal development through effects on osteoblast gene expression, bone mineral density, and bone strength. **Alcohol Clin Exp Res.** V.23, n.9, p.1534-1542, 1999.