

JULIANA MADUREIRA DE SOUZA LIMA ALONSO

**INFLUÊNCIA DO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL 20%
NA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATAS COM
DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA**



2009

JULIANA MADUREIRA DE SOUZA LIMA ALONSO

**INFLUÊNCIA DO CONSUMO CRÔNICO DE ETANOL 20% NA DOENÇA
PERIODONTAL INDUZIDA EM RATAS COM DEFICIÊNCIA
ESTROGÊNICA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

Orientadora: Prof^a Adj. Rosilene Fernandes da Rocha

São José dos Campos

2009

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos Campos:
FOSJC/UNESP; 2008

A72i	Alonso, Juliana Madureira de Souza Lima. Influência do consumo crônico de etanol 20% na doença periodontal induzida em ratas com deficiência estrogênica /Juliana Madureira de Souza Lima Alonso. São José dos Campos : [s.n.], 2009. 142f. : il. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2009. Orientador: Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha. 1. Alcoolismo. 2. Osteoporose. 3. Ovariectomia. 4. Doenças periodontais. I. Rocha, Rosilene Fernandes da. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título
	tD64

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 23 de Outubro de 2009.

Assinatura:

E-mail: jumadureira@uol.com.br; julianamadureira@hotmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha (orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof Tit. Horácio Faig Leite

Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

Profa. Dra. Lucilene Hernandes Ricardo

Departamento de Odontologia
Universidade de Taubaté – UNITAU

Profa. Dra. Marianne Spalding

Faculdade de Odontologia
Faculdade de Pindamonhangaba – FAPI

São José dos Campos, 23 de outubro de 2009.

DEDICATÓRIA

À **Deus** por permitir que meus mestres me provenham de saúde e sabedoria e assim, que eu possa contribuir para a saúde e sabedoria daqueles que dependem de mim.

Ao meu marido **Renato Barchetta Alonso**, pelo carinho, consideração e apoio incondicional, sem o qual não seria possível materializar este sonho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu pai **Lauro de Souza Lima Sobrinho**, por seu incentivo, amor e dedicação. Seu exemplo de garra e determinação e suas palavras de incentivo foram responsáveis pela superação dos vários obstáculos para concretizar esta etapa de minha vida.

As minhas mães **Regina Célia Madureira de Souza Lima** (*in memoriam*) pelo conforto e guarda espiritual, que sua presença possa sempre nos acalantar e **Márcia Maria de Moura** pelo carinho e dedicação, os quais certamente me tornaram uma pessoa melhor.

A minha amiga, mãe e eterna orientadora, **Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha**, pela oportunidade de convivência, aprendizagem e, sobretudo confiança. Espero que após orientar-me no Mestrado e Doutorado possa continuar me orientando para a vida. Reverencio a profissional e a amiga pelo que é e pelo que sempre significou para mim.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, **Prof. Adj. José Roberto Rodrigues** e do vice-diretor **Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli**. Agradeço pela possibilidade de concluir esta etapa.

À Faculdade de Pindamonhangaba - FAPI, na pessoa do diretor **Prof. Luís Otávio Palhari** e do vice-diretor **Prof. Juliano Palhari**. Agradeço pela confiança e oportunidade.

À **Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito**, coordenadora da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, pela competência, modéstia e clareza ao exercer seu cargo.

À **Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão**, por pacientemente compartilhar a leitura dos cortes histológicos e pelas preciosas sugestões.

À **Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho** pelas sugestões e conhecimento transmitido. Sua contribuição foi muito valiosa.

Ao **Prof. Ivan Balducci** pela persistência e paciência durante a estatística. Agradeço por cada sexta-feira.

A **todos** os docentes de Pós-Graduação pelo convívio e oportunidade de aprendizagem

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Biopatologia Bucal: **Ana Lourdes da Silva Machado, Antônio Domingos Sávio Barbosa Maia Vasconcelos, Lourival Jacobs, Marco Antonio Correa Alfredo, Maria Salete Faria** pela amizade e por todo o suporte e atenção, sem os quais seria impossível concluir o experimento.

Às funcionárias da biblioteca da FOSJC em especial **Silvana Alvarez e Renata Aparecida Couto**, pelo auxílio na literatura e revisão das normas de apresentação deste trabalho.

A **todos** os colegas da Pós-Graduação pela convivência e pela troca de experiências.

À amiga **Daniela Martins de Souza** agradeço pela parceria e carinho em nossa carreira periodontal e, sobretudo pela ajuda na construção desta tese desde seu projeto a sua última página.

À amiga **Renata Falchete do Prado** pelas longas explicações e paciência em compartilhar seus conhecimentos.

Aos alunos de Iniciação Científica: **Carolina Leal Martins, Geraldo M. Miranda, Débora Amadio de Lima, Fabiana C. Frattes, Alberto Toseto Binde e Emanuel da Silva Rovai** por terem participado do grupo “álcool” cada um com sua contribuição e seu valor e por possibilitar que como co-orientadora eu amadurecesse. Meu sincero voto de sucesso!

Aos meus irmãos **Teresa Cristina Madureira de Souza Lima e Flávio Madureira de Souza Lima**, obrigado pela unidade. Seremos sempre “um por todos e todos por um”.

À amiga **Cristina Werkman** por todos os momentos de ajuda e dedicação. Nossa colheita foi a superação e uma amizade verdadeira sempre viva em nossos corações.

Às amigas **Karina Bortolin Lodi** e **Adriana Mathias P. S. Marchini**, por dividirem momentos tão especiais. Agradeço por toda amizade e apoio neste Doutorado. Será sempre um prazer em tê-las como equipe.

À amiga **Giselle Segnini Senra** pela amizade e senso de equipe os quais fizeram a diferença.

À amiga **Lucilene Hernandes Ricardo** por ter me direcionado no caminho científico, tendo sempre como alicerce a ética e amizade.

Às minhas amigas e parceiras **Simone Conti** e **Cristiana Tengan**, cuja amizade e verdadeiro senso de equipe impulsionam as grandes conquistas.

À **Marianne Spalding** pela sincera amizade. Lembro-me sempre de você... 1, 2, 3, 4...

Aos meus amigos para todas as horas **Marcos Antônio Minicucci**, **Alessandra A. Silva Minicucci**, **Marcel Afonso B. Moreira** e **Solange Balbino Moreira**, agradeço pelos momentos felizes e pela franca amizade.

As minhas fiéis escudeiras **Nathalie Moraes Marin** e **Tâmara das Graças Carvalho**, pelo apoio nas horas em que mais preciso.

Aos queridos **tios, sogros, cunhados, sobrinhas e afilhadas**, agradeço pelo maravilhoso convívio, atenção e ensinamentos de vida e família.

A **todos** aqueles que direta ou indiretamente muito contribuíram no convívio diário.

SUMÁRIO

RESUMO	11
LISTAS DE FIGURAS E TABELAS	12
LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS	15
1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 Alcoolismo	21
2.1.1 Efeitos sistêmicos.....	21
2.1.2 Efeitos relacionados aos gêneros.....	26
2.1.3 Modulação do sistema imune.....	27
2.2 Contribuições da deficiência estrogênica e alcoolismo para a doença periodontal	32
2.2.1 Implicações da pós-menopausa no metabolismo ósseo.....	32
2.2.2 Implicações do alcoolismo no metabolismo ósseo.....	34
2.2.3 Considerações gerais sobre a doença periodontal.....	38
2.2.3.1 Alcoolismo e osteoporose como indicadores de risco para doença periodontal.....	40
2.2.3.2 Considerações sobre osteoporose e doença periodontal.....	41
2.2.3.3 Considerações sobre o alcoolismo e doença periodontal.....	45
2.3 Considerações para doença periodontal experimental em ratos	48
3 PROPOSIÇÃO	55
4 MATERIAL E MÉTODO	56
4.1 Animais	56
4.1.1 Grupos experimentais.....	56
4.2 Sistemática de realização do experimento	60
4.2.2 Castração dos animais.....	60
4.2.2 Simulação cirúrgica (SHAM)	62
4.2.3 Dieta.....	62

4.2.3.1 Dieta líquida.....	62
4.2.3.2 Dieta sólida.....	63
4.2.4 Indução da doença periodontal.....	63
4.2.5 Sacrifício dos animais.....	64
4.3 Metodologia para análises.....	66
4.3.1 Alterações de peso corpóreo e condição nutricional.....	66
4.3.2 Alterações periodontais.....	67
4.3.2.1 Análise histológica e histomorfométrica.....	67
4.3.2.1.1 Avaliação histomorfométrica do nível ósseo interproximal...	68
4.3.2.1.2 Avaliação da inserção periodontal interproximal.....	69
4.3.2.1.3 Avaliação histológica do processo inflamatório e reabsorção óssea interproximal.....	70
4.3.3 Análise estatística.....	81
5 RESULTADOS.....	83
5.1 Alteração do peso corpóreo e condição nutricional.....	83
5.2 Avaliações periodontais.....	89
5.2.1 Avaliação histomorfométrica do nível ósseo interproximal.....	89
5.2.1.1 Ausência de doença periodontal.....	89
5.2.1.2 Presença de doença periodontal induzida.....	90
5.2.2 Avaliação da inserção periodontal interproximal.....	92
5.2.1.1 Ausência de doença periodontal.....	92
5.2.1.2 Presença de doença periodontal induzida.....	93
5.2.3 Avaliação histológica do processo inflamatório e reabsorção óssea interproximal.....	95
5.2.1.1 Ausência de doença periodontal.....	95
5.2.1.2 Presença de doença periodontal induzida.....	108
6 DISCUSSÃO.....	119
7 CONCLUSÃO.....	131
8 REFERÊNCIAS.....	132
ANEXO.....	141
ABSTRACT.....	142

Alonso JMSL. Influência do consumo crônico de etanol 20% na doença periodontal induzida em ratas com deficiência estrogênica [tese de Doutorado]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP; 2009.

RESUMO

Condições sistêmicas do hospedeiro podem modular a resposta inflamatória periodontal, determinando variação em relação à susceptibilidade individual e velocidade de progressão da doença periodontal. Dentre os fatores sistêmicos adquiridos, a osteoporose e o alcoolismo são descritos na literatura, como indicadores de risco para a perda óssea associada à doença periodontal. Este estudo objetivou analisar, para ratas Wistar, a influência do consumo crônico do etanol 20% associado à deficiência estrogênica considerando aspectos histológicos e histomorfométricos. Foram utilizadas sessenta ratas, com aproximadamente noventa dias, divididas em dois grupos correlacionados à cirurgia (OVZ) ou simulação cirúrgica de ovariectomia (SHAM). Cada grupo foi dividido em três subgrupos: (C) dieta controle, (A) dieta alcoólica 20% e (I) solução isocalórica ao etanol 20%. Após trinta dias da castração, iniciou-se a dieta e indução de periodontite experimental no primeiro molar inferior esquerdo, as quais foram mantidas por 56 dias. As regiões interproximais entre primeiro e segundo molar inferior esquerdo e o sítio contralateral sem indução da doença periodontal foram avaliadas quanto ao nível ósseo, perda de inserção e características inflamatórias. Os resultados demonstraram que em relação à significância para SHAM-C e OVZ-C, a deficiência hormonal não foi capaz de induzir ou agravar a perda óssea na doença periodontal, mas acarretou alterações inflamatórias importantes. Considerando os grupos SHAM e OVZ e a ausência de doença periodontal, o etanol acarretou perda óssea e alterações inflamatórias para ambos os grupos, sendo observada maior severidade quando combinado à ovariectomia. Nas ratas com periodontite induzida, OVZ ou SHAM, o consumo de etanol 20% não influenciou a perda óssea e perda de inserção. Notou-se maior contribuição da deficiência nutricional (A e I) para a severidade da inflamação periodontal quando combinada à deficiência estrogênica.

Palavras-chave: Alcoolismo. Osteoporose. Doenças periodontais. Ovariectomia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Regulação da secreção de citocina em função do consumo agudo ou crônico do etanol e fatores co-estimulatórios.....	29
Figura 2	- Imunossupressão via hormônio-dependente induzida pelo etanol.	31
Figura 3	- Distribuição do grupo experimental SHAM em função da dieta controle, alcoólica e isocalórica.	58
Figura 4	- Distribuição do grupo experimental OVZ em função da dieta controle, alcoólica e isocalórica.	59
Figura 5	- Ovariectomia.	61
Figura 6	- Indução de doença periodontal por meio de ligadura..	64
Figura 7	- Hemi-mandíbula preparada para fixação.....	65
Figura 8	- Delineamento experimental.	65
Figura 9	- Análise histomorfométrica do suporte ósseo interproximal.	69
Figura 10	- Análise histomorfométrica do nível de inserção periodontal interproximal.	70
Figura 11	- Posicionamento do epitélio juncional em relação à JCE.	73
Figura 12	- Esquema representativo da proliferação epitelial.....	73
Figura 13	- Esquema representativo da degeneração hidrópica observada no epitélio juncional.	74
Figura 14	- Quantificação de células fibroblásticas do tecido conjuntivo gengival.	74
Figura 15	- Representação do índice inflamatório.....	75

Figura 16 - Representação da hialinização das fibras colágenas gengivais.....	75
Figura 17 - Representação da orientação fibras gengivais supracristais.	76
Figura 18 - Representação da inserção das fibras gengivais supracristais.	76
Figura 19 - Contorno da crista óssea interproximal.....	77
Figura 20 - Representação das lacunas de Howship.....	77
Figura 21 - Esquema representativo da quantificação fibroblástica do ligamento periodontal.	78
Figura 22 - Desorientação das fibras do ligamento periodontal.	78
Figura 23 - Representação da inserção das fibras do ligamento periodontal.	79
Figura 24 - Peso corpóreo inicial dos animais experimentais.....	84
Figura 25 - Alteração de peso corpóreo dos animais experimentais.	85
Figura 26 - Consumo calórico em função da dieta sólida para os grupos experimentais.....	87
Figura 27 - Consumo calórico em função da dieta líquida para os grupos experimentais.	88
Figura 28 - Nível ósseo interproximal (NOi) dos grupos experimentais sem doença periodontal induzida.....	90
Figura 29 - Nível ósseo interproximal (NOi) dos animais experimentais com doença periodontal induzida.....	91
Figura 30 - Inserção periodontal interproximal (IPi) dos animais experimentais sem doença periodontal induzida.....	93
Figura 31 - Inserção periodontal interproximal (IPi) dos animais experimentais com doença periodontal induzida.....	94
Figura 32 - Imagem representativa do grupo C-SHAM sem a indução da doença periodontal.....	96

Figura 33 - Imagem representativa do grupo C-OVZ sem a indução da doença periodontal.....	97
Figura 34 - Imagem representativa do grupo A-SHAM sem a indução da doença periodontal.....	97
Figura 35 - Imagem representativa do grupo A-OVZ sem a indução da doença periodontal.....	98
Figura 36 - Imagem representativa do grupo I-SHAM sem a indução da doença periodontal.....	98
Figura 37 - Imagem representativa do grupo I-OVZ sem a indução da doença periodontal.....	99
Figura 38 - Representação do perfil de distribuição das características histológicas em função dos subgrupos SHAM sem indução da doença periodontal.....	103
Figura 39 - Representação do perfil da distribuição das características histológicas em função dos subgrupos OVZ sem indução da doença periodontal.....	105
Figura 40 - Representação do perfil da distribuição das características histológicas em função dos subgrupos SHAM e OVZ sem indução da doença periodontal.....	107
Figura 41 - Imagem representativa do grupo C-SHAM com a indução da doença periodontal.....	109
Figura 42 - Imagem representativa do grupo C-OVZ com a indução da doença periodontal.....	109
Figura 43 - Imagem representativa do grupo A-SHAM com a indução da doença periodontal.....	110
Figura 44 - Imagem representativa do grupo A-OVZ com a indução da doença periodontal.....	110
Figura 45 - Imagem representativa do grupo I-SHAM com a indução da doença periodontal.....	111
Figura 46 - Imagem representativa do grupo I-OVZ com a indução da doença periodontal.....	111

Figura 47 - Representação do perfil da distribuição das características histológicas em função dos subgrupos SHAM com indução da doença periodontal.....	115
Figura 48 - Representação do perfil da distribuição das características histológicas em função dos subgrupos OVZ com indução da doença periodontal.....	117
Figura 49 - Representação das características histológicas em função dos subgrupos SHAM e OVZ com indução da doença periodontal.....	118

LISTAS DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	- Possibilidades para observações histológicas.....	80
Quadro 2	- Comportamento histológico periodontal interproximal dos animais sem indução da doença periodontal.....	100
Quadro 3	- Comportamento histológico periodontal interproximal dos animais com indução da doença periodontal.....	112
Tabela 1	- Médias e desvio-padrão do peso corpóreo inicial nos grupos experimentais.....	83
Tabela 2	- Médias e desvio-padrão da alteração do peso corpóreo percentual nos grupos experimentais.....	85
Tabela 3	- Médias e desvio-padrão Kcal resultantes do consumo de ração nos grupos experimentais.....	86
Tabela 4	- Médias e desvio padrão das Kcal resultantes do consumo líquido nos grupos experimentais.....	87
Tabela 5	- Médias e desvio-padrão do percentual de Kcal representado pelo consumo da ração e dieta líquida nos grupos experimentais.....	88
Tabela 6	- Médias e desvio padrão do NOi nos grupos experimentais sem doença periodontal induzida.....	90
Tabela 7	- Médias e desvio padrão do NOi nos grupos experimentais com doença periodontal induzida.....	91
Tabela 8	- Médias e desvio padrão do IPi nos grupos experimentais sem doença periodontal induzida.....	92
Tabela 9	- Médias e desvio padrão do IPi nos grupos experimentais com doença periodontal induzida.....	94

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH	= álcool desidrogenase
ALDH ₂	= aldeído-desidrogenase
bFGF	= fator de crescimento fibroblástico básico
COA	= crista óssea alveolar
COBEA	= Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
dL	= decilitro
DMO	= densidade mineral óssea
DNA	= ácido nuclear dinucleotídeo
EDTA	= etilendinetriilo tetra-acético-sal dissódico dihidratado
g	= grama
g/kg	= gramas por kilograma de peso
GM-CSF	= fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos
HE	= hematoxilina e eosina
HPA	= adrenal-hipotalâmico-pituitário
IFN _γ	= interferon γ
IL-1	= interleucina-1
IL-1 α	= interleucina-1 α
IL-1 β	= interleucina-1 β
IL- 10	= interleucina-10
IL- 12	= interleucina-12
IL-16	= Interleucina-16
IL- 6	= interleucina-6
IL- 8	= interleucina-8
iNOS	= óxido nítrico sintetase induzível
IPI	= Inserção Periodontal interproximal
JCE	= junção cimento-esmalte

kcal/g	= kilocaloria por grama
LB	= linfócitos B
LPS	= Lipopolissacarídeo
LT	= linfócitos T
µg/kg/d	= micrograma por kilograma de peso por dia
M-CSF	= fator estimulador de colônias de macrófagos
mg	= miligrama
mL	= mililitro
MMP	= metaloproteinases da matriz extracelular
MMP-9	= metaloproteinase-9
NAD ⁺	= nicotinamida adenina dinucleotídeo
NOs	= óxido nítrico sintetase
NOi	= Nível Ósseo interproximal
OVZ	= cirurgia de ovariectomia/ ovariectomizado
oz	= ounces
PGE ₂	= prostaglandina E ₂
PMN	= neutrófilos polimorfonucleares
RANKL	= fator κB receptor e ativador para osteoclastos
RNA _m	= RNA mensageiro
SHAM	= simulação cirúrgica de castração
TRAP	= Tartrate-resistant Acid-phosphatase-stained
TGF-β	= fator de crescimento transformante β
TNFα	= fator de necrose tumoral α
TRH	= terapia de reposição hormonal
THP	= terapia hormônio paratireoidiano

1 INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma alteração imuno-inflamatória das estruturas de tecido de suporte dos dentes, iniciada pelo biofilme dental e alterada por fatores intrínsecos ou adquiridos pelo indivíduo. Dentre os fatores moduladores para a progressão da periodontite a osteoporose, a osteopenia e o alcoolismo vêm sendo considerados pela literatura como importantes indicadores de um maior risco para a periodontal.

Os resultados de estudos em modelos animais sugerem que o consumo abusivo do etanol aumenta a susceptibilidade às infecções bacterianas e influencia diretamente os níveis de cálcio, fósforo e magnésio, implicando ou agravando patologias ósseas, neurológicas e dermatológicas (Szabo, 1999; Crews et al., 2006; Moe, 2008).

O impacto do alcoolismo é frequentemente maior para mulheres e, especialmente quando associado à deficiência estrogênica interfere negativamente na remodelação óssea, acentuando as deficiências comumente observadas para mulheres com osteopenia ou osteoporose (Epstein et al., 2007; Dettling et al., 2008).

Neste sentido, o consumo crônico do etanol por pacientes com deficiência estrogênica, pode influenciar diretamente o potencial imunológico e alterar funções metabólicas importantes para a homeostasia óssea, os quais, associados às bactérias periodontopatogênicas, seriam capazes de acelerar o processo de reabsorção óssea observado na doença periodontal (Kovacs; Messingham, 2002; Crews et al., 2006).

O presente trabalho se justifica pela possibilidade de verificar o efeito conjunto e possivelmente potencializador, da deficiência

estrogênica e do uso crônico do álcool, na periodontite induzida em ratas. O modelo de periodontite induzida em ratas castradas padroniza variáveis como idade, consumo alcoólico, intensidade do fator hormonal, interferência de outros fatores de risco e possibilidade de controle dietético, os quais dificultariam os estudos em humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alcoolismo

2.1.1 Efeitos sistêmicos

Para se definir um adequado termo para o abuso do álcool, um comitê com 23 membros multidisciplinares do Conselho Nacional de Alcoolismo e Dependências de Drogas de New Jersey e a Sociedade Americana de Medicina Adicional conduziram um estudo de dois anos, no qual foi criada, por consenso, uma definição revisada que fosse cientificamente válida, clinicamente aplicável e compreendida pelo público em geral. Assim o alcoolismo foi considerado como termo popular cientificamente aceito e engloba dois distúrbios: o abuso e a dependência do álcool, sendo que o abuso se distingue da dependência pelo controle sobre a bebida alcoólica; no entanto, apresenta as mesmas consequências a longo prazo e é um fator de risco para a dependência. O alcoolismo foi definido como uma doença crônica caracterizada pelo consumo excessivo e/ou dependência de bebidas alcoólicas, apresentando fatores etiológicos genéticos, psicosociais e ambientais, os quais são capazes de influenciar e desenvolver manifestações sistêmicas. Esta patologia foi caracterizada como progressiva e fatal, bem como tendo impacto na sociedade geral (Morse; Flavin, 1992).

Os efeitos do alcoolismo são relevantes sistemicamente e inclui má nutrição, distúrbios de memória, perda do equilíbrio, doenças hepáticas (incluindo cirrose e hepatite), desordens gastrintestinais,

hipertensão arterial, fraqueza/atrofia muscular (incluindo o coração), anemia, hipoglicemia, desordens de coagulação, queda da imunidade, desordens reprodutivas e patologias ósseas. De modo pessoal incluem depressão, problemas conjugais, profissionais, pedofilia e afastamento da família e amigos. Para a sociedade gera uma série de problemas como homicídios, suicídios, acidentes rodoviários e crimes violentos (Addorolato et al., 1997; WHO, 1999; Al-Sanouri et al., 2005; Gonzáles-Reimers et al., 2005; Epstein et al., 2007).

Para a Organização Mundial de Saúde, o abuso do álcool (mais apropriadamente referido como etanol) é um dos fatores de maior contribuição para a mortalidade de homens, especialmente jovens e de meia idade. É geralmente acompanhado pelo uso de outras substâncias como nicotina, maconha, cocaína, anfetaminas, heroína, sedativos e ansiolíticos (WHO, 1999).

Segundo levantamento feito por Galduróz et al. (2005) abrangendo 107 cidades brasileiras com mais de duzentos mil habitantes, dos 8589 entrevistados com idades entre 12 a 65 anos, o consumo do etanol já fora efetuado por pelo menos 77,3% dos homens e 60,6% das mulheres, sendo que estas proporções se mantiveram estáveis nas diferentes faixas etárias estudadas.

Depois de ingerido, o etanol é absorvido em pequena quantidade no estômago e o restante, aproximadamente 80%, no intestino. As enzimas álcool desidrogenase (ADH) e aldeído-desidrogenase (ALDH₂) contribuem no processo de biotransformação do etanol. Fatores como proporção de etanol consumido, presença de alimentos no estômago, tipo de bebida alcoólica e fatores genéticos influenciam a capacidade de absorção estomacal. No fígado ocorre cerca de 80% da biotransformação, onde também participam as enzimas ADH e ALDH₂, sendo o etanol oxidado em acetaldeído (um bioproducto altamente reativo e tóxico, que contribui para o dano hepato-celular) e depois em acetato, o qual é metabolizado em nicotinamida adenina dinucleotídeo

(NAD⁺) e oxidado por uma série de reações mitocondriais, inclusive por tecidos que não contêm ADH, como cérebro, coração e músculos. Uma segunda via não oxidativa, resulta em ácidos graxos e lipídios. As diferentes vias de metabolismo contribuem para o dano tecidual direto (decorrentes de efeitos na sinalização de proteínas e desordens na membrana celular) e patologias observadas em alcoolistas (Zakhari, 2006).

Embora o etanol tenha alto valor calórico (7,1kcal/g), suas calorias são consideradas “vazias”, sem relação com nutrientes como proteínas, minerais ou vitaminas. O consumo abusivo gera depreciação do sistema nervoso e introduz hábitos alimentares irregulares com perda na qualidade da dieta, o que agrava o estado nutricional do indivíduo (Santolaria et al., 2000; Lieber, 2003).

Além disso, a utilização energética do etanol é, geralmente, ineficiente devido à ativação do sistema de oxidação celular microssomal. Este efeito ativa neurotransmissores e altera a sinalização química da dopamina e serotonina, contribuindo com a vulnerabilidade à dependência, intoxicação e a perda de peso observada em alcoolistas. Os sinais de intoxicação são frequentemente evidentes quando o indivíduo apresenta níveis de etanol no sangue maiores que 100mg/dL (Schreiber, 2001).

Considerando que as fraturas são um achado bastante comum em alcoolistas, constituindo até mesmo um indicador do alcoolismo, Gonzáles-Reimers et al. (2005) avaliaram 81 alcoolistas crônicos (consumo mínimo de 150g/dia por cinco anos) hospitalizados e 42 pacientes controles, e observaram que a alta prevalência para fraturas de costelas em alcoolistas crônicos (49,3%) foi mais dependente do estilo de vida peculiar como: emprego, lazer, membros familiares alcoolistas, estado civil, alimentação irregular e quantificação da dependência alcoólica em relação ao índice de massa corpórea, densidade óssea mineral e hormônios séricos envolvidos na homeostasia óssea.

Também o estado nutricional relacionado ao alcoolismo foi discutido por pesquisadores como fator de risco no desenvolvimento de doenças sistêmicas, causando importantes danos no cérebro, cerebelo e nervos periféricos (Nicolás et al., 2000; García-Valdecasas-Campelo et al., 2007).

Destas alterações, Nicolás et al. (2000) constataram, por meio de exames neurológicos, exames sanguíneos e índice de massa corpórea, uma significativa atrofia cerebelar nos alcoolistas, com maior significância quando o consumo diário de etanol era maior que 140g/dia por mais de dez anos, sendo que a presença de má nutrição foi associada com um risco seis vezes maior para esta significativa redução cerebelar.

Para García-Valdecasas-Campelo et al. (2007) em estudo de 36 alcoolistas crônicos que consumiam mais de 150g de etanol/dia por mais de cinco anos, a relação da atrofia cerebral e/ou cerebelar, verificadas por tomografia computadorizada e, sua possível relação com hormônios sexuais, citocinas, estado nutricional, idade e disfunção hepática existe, porém de baixa significância, sugerindo que outros fatores como quantidade de etanol consumido, genética, vitaminas e micronutrientes possam estar envolvidos em sua patogênese.

Das alterações sistêmicas, devido ao uso do etanol, descritas na literatura, as alterações neurológicas (especialmente encefalopatia de *Wernicke* e encefalopatia hepática), respiratórias (principalmente pneumonia e síndrome da insuficiência respiratória aguda), gastrintestinais (como úlceras, varizes esofagianas, ascites, cirrose hepática e pancreatite), cardiovasculares (como cardiomiopatia, disritmia atrial e ventricular e angina) e metabólicas/renais (como glomerulonefropatia, hipocalcemia, hipomagnesemia, hipofosfatemia, hipoglicemia, cetoacidose e acidose láctica) são listadas como sendo as principais alterações que necessitam de cuidados intensivos (Al-Sanouri et al., 2005; Zakari, 2006).

Outro agravante a ser considerado, é que o consumo crônico do etanol aumenta o risco para tumores do sistema digestivo e respiratório, especialmente quando combinado com fumo, e predisposição genética. Diversos fatores, dentre estes idade e fatores hormonais, contribuem para a patogênese do tumor associado ao etanol, especialmente a síntese de acetaldeído pela enzima ADH e ADH₂, podendo atuar na replicação do DNA, induzindo danos ou mesmo alterando a sua formação (Seitz, 2007).

Embora o uso moderado do etanol esteja associado com elevado risco de infarto do miocárdio, Mukamal et al. (2006) observaram em estudo prospectivo de 16 anos com 8867 homens, que o consumo do etanol (5 a 29 g/dia) associado a pelo menos três fatores para o baixo risco à doença coronariana (como dieta adequada, atividade física regular e não fumar) tendia a ser similar ao baixo risco observado para homens com estilo de vida saudável com abstinência alcoólica ou que consumiam entre 15 e 29,9 g/dia.

O Instituto Nacional de Abuso do Álcool e Alcoolismo (NIAAA), nos Estados Unidos, definiu os limites de uso do etanol por “dose padrão”. Essa dosagem foi considerada para bebidas alcoólicas, quando estas contêm mais que 14g de etanol puro, sendo considerado como baixo risco a ingestão diária de menos de 12 ounces (oz) de cerveja doméstica, por conter aproximadamente 5% de etanol (equivalente a 350mL ou 340g), 5oz de vinho, por conter aproximadamente 12% de etanol (equivalente a 150mL ou 141g) e 1,5oz de licor por conter aproximadamente 40% de etanol (equivalente a 40 mL ou 42g). Também considerado baixo risco o consumo generalizado de sete taças por semana quando homens e mulheres tiverem mais que 65 anos. Tal dosagem é considerada não problemática se o indivíduo for saudável, sem uso de medicações que reajam negativamente com o etanol e que não pretenda dirigir (Epstein et al., 2007).

2.1.2 Efeitos relacionados aos gêneros

Fisiologicamente mulheres de todas as idades são mais susceptíveis aos efeitos de bebidas alcoólicas que os homens. Isso devido a uma menor quantidade de água corpórea que um homem de mesmo peso, menor massa muscular e menor nível da enzima álcool desidrogenase, responsável pela biotransformação do etanol no estômago. Sendo comum observar na literatura estudos que indicam para o gênero feminino maior neurotoxicidade, maior debilidade sistêmica e importantes sequelas como depressão, doenças cardiovasculares, neoplasias malignas, doenças hepáticas e patologias ósseas (Epstein et al., 2007).

As diferenças entre os gêneros não estão apenas associadas à susceptibilidade ao etanol, mas também a sua farmacocinética, conforme observado por Dettling et al. (2008) em estudo com 47 homens saudáveis (idade média de $25 \pm 6,1$ anos e consumo médio de etanol de $1,50 \pm 0,88$ g/kg de peso corpóreo, por semana) e 61 mulheres saudáveis (idade média de $24 \pm 2,4$ anos e consumo médio de etanol de $0,94 \pm 0,96$ g/kg de peso corpóreo, por semana). Segundo os autores a biotransformação foi alterada pelos níveis de progesterona, estradiol e testosterona. Foi observado que mulheres com maiores níveis de progesterona eliminavam significativamente mais etanol que mulheres com menores níveis de progesterona ou que homens.

Assim como a biotransformação do etanol é influenciada pelos gêneros, o etanol também pode interferir diretamente no equilíbrio hormonal e função reprodutiva feminina ou masculina via sistema neuro-hormonal e indiretamente via hepática ou deficiência de ácido fólico devido à diminuição da absorção intestinal e aumento da excreção renal (Kovacs; Messingham, 2002; Augustyńska et al., 2007; Wallock-Montelius et al., 2007; Dettling et al., 2008).

Segundo dados avaliados por Wallock-Montelius et al. (2007) quanto à relação do consumo de etanol 40%, por *Yucatan micropig*, durante 14 semanas e os efeitos no sistema reprodutor masculino, o consumo crônico de etanol reduziu o peso dos testículos e epidídimos, concentração do espermatozoides testicular, contagem total de espermatozoides e níveis séricos de hormônio folículo estimulante (FSH). Foram observadas evidências histológicas de lesões testiculares ou incompleta progressão da espermatogênese.

De acordo com os resultados obtidos por Augustynka et al. (2007) com trinta mulheres com idade média de 36 ± 6 anos (as quais tinham em média três anos de dependência alcoólica), o distúrbio hormonal e alterações no ciclo ovariano com o consumo de etanol por trinta dias, seguidos de desintoxicação, ocorreu mesmo diante da abstinência alcoólica. Mais que 50% das mulheres tiveram um aumento anormal de prolactina e diminuição de progesterona e luteotropina (necessários para preparação uterina e maturação/ liberação do óvulo respectivamente), sendo que os efeitos foram mais evidentes na fase ovulatória.

2.1.3 Modulação do sistema imune

A genética, idade, gênero, hábitos como o fumo e consumo de álcool etílico, presença de atividades físicas, dieta, fatores hormonais, estresse e histórias de infecções e vacinações são importantes contribuidores para as alterações do sistema imune. Dentre estes fatores, o estado nutricional tem um importante papel na resposta imune, sendo a desnutrição e o alcoolismo capazes de suprimir funções imunes fundamentais para a resposta do hospedeiro frente a processos infecciosos (Calder; Kew, 2002).

Assim como a má nutrição e deficiência vitamínica podem colaborar com algumas das anormalidades observadas em alcoolistas crônicos, a hepatotoxicidade associada ao consumo abusivo do etanol, é responsável pelos altos níveis de citocinas, como a interleucina 10 (IL-10), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina 6 (IL-6), observadas em alcoolistas. Estas citocinas provêm principalmente de hepatócitos e células de Kupffer (estas últimas apresentam papel crucial na defesa antimicrobiana), assim, a hepatite alcoólica pode ser considerada como uma condição inflamatória (Naveau et al., 2005).

O efeito do etanol na resposta imune varia para consumos agudos e crônicos, bem como depende do histórico deste consumo, do nível de etanol sérico e da complexidade de fatores co-estimulatórios. Para consumos agudos e moderados existem efeitos antiinflamatórios pela inibição das citocinas pró-inflamatórias e aumento das citocinas antiinflamatórias produzidas por monócitos. O uso crônico, especialmente associado à hepatite, causa ativação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina 1 (IL-1) e IL-6. Embora alcoolistas tenham elevados níveis de anticorpos circulatórios, a alteração dos níveis de citocinas em uma variedade de tecidos incluindo fígado, pulmão, cérebro e plasma, acabam por desregular a função dos anticorpos, em especial pela alteração das citocinas pró-inflamatórias como interleucina 8 (L-8) e IL-10. Este processo associado à presença de patógenos pode representar uma maior extensão para os danos causados pelo etanol e determinam variações na produção de citocinas pró ou antiinflamatórias, permitindo inclusive uma super-ativação dos monócitos, a qual pode contribuir com a inflamação (Crews et al. 2006).

A Figura 1 representa os possíveis efeitos do uso agudo e crônico do etanol para o processo inflamatório discutidos por Crews et al. (2006).

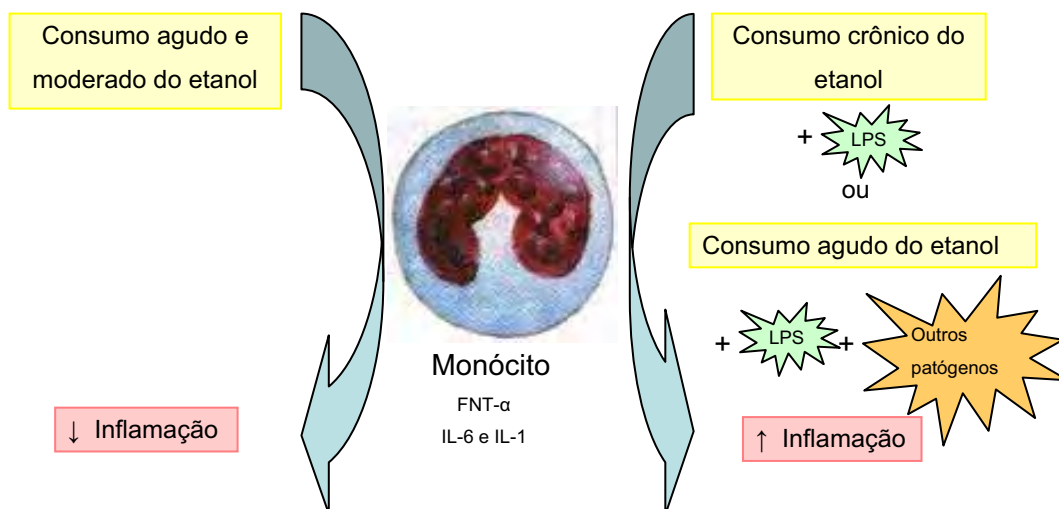


Figura 1 - Regulação da secreção de citocina em função do consumo agudo ou crônico do etanol e fatores co-estimulatórios. O consumo agudo reduz processo inflamatório mediado pelo monócito. O uso crônico e lipopolissacarídeo (LPS) e consumo agudo e LPS com o ativação de múltiplos patógenos aumentam a indução de citocinas inflamatórias primariamente produzidas por monócitos. Adaptação do esquema proposto por Crews et al. (2006).

Também foi considerado por Szabo (1999) que o etanol, em relevantes concentrações, diminui a capacidade de apresentação de antígenos por monócitos e células dendríticas, assim como pode aumentar a produção de fator de crescimento transformante β (TGF- β) por monócitos em resposta a infecções bacterianas específicas. A elevação de TGF- β induzida pelo etanol pode ter múltiplas implicações negativas para o sistema imune, interferindo na síntese da prostaglandina E2 (PGE2).

Embora a meia vida das citocinas seja geralmente curta, alguns níveis tendem a se normalizar dentro de poucos dias após uma injúria aguda e segundo Gonzáles-Quintela et al. (2000) após seis dias de abstinência alcoólica, os níveis de citocinas pró-inflamatórias decrescem chegando ao normal ou próximo do normal.

Para homens e mulheres, as diferentes respostas imunes são decorrentes, principalmente, de estímulos hormonais, como o estrógeno (que em geral, estimula o sistema imune) e a testosterona, a qual é imunossupressora. Na ausência de exposição ao etanol a resposta imuno-inflamatória feminina é bem mais intensa que a masculina. No entanto, quando co-estimulada pelo etanol, a imunidade feminina apresenta-se com menor capacidade defensiva. Esta diminuição da imunidade, após o consumo de grande quantidade de etanol, tem mecanismos ainda incertos, mas provavelmente associados, sendo observado para as mulheres, um inicial aumento nos níveis de estrógeno, seguido por uma intensa diminuição. Para os homens, há uma diminuição nos níveis de testosterona. Em ambos os gêneros, o elevado consumo do etanol pode estar associado a glicocorticóides imunossupressores sintetizados via eixo adrenal-hipotalâmico-pituitário (HPA), causando estresse celular e diminuição da capacidade imune. Assim, podem existir nas mulheres, duas importantes vias de imunossupressão induzidas pelo etanol, enquanto que para os homens, existe somente uma via com potencial de imunossupressão (Kovacs; Messingham, 2002).

A Figura 2 resume as respostas imunológicas para o gênero masculino e feminino.

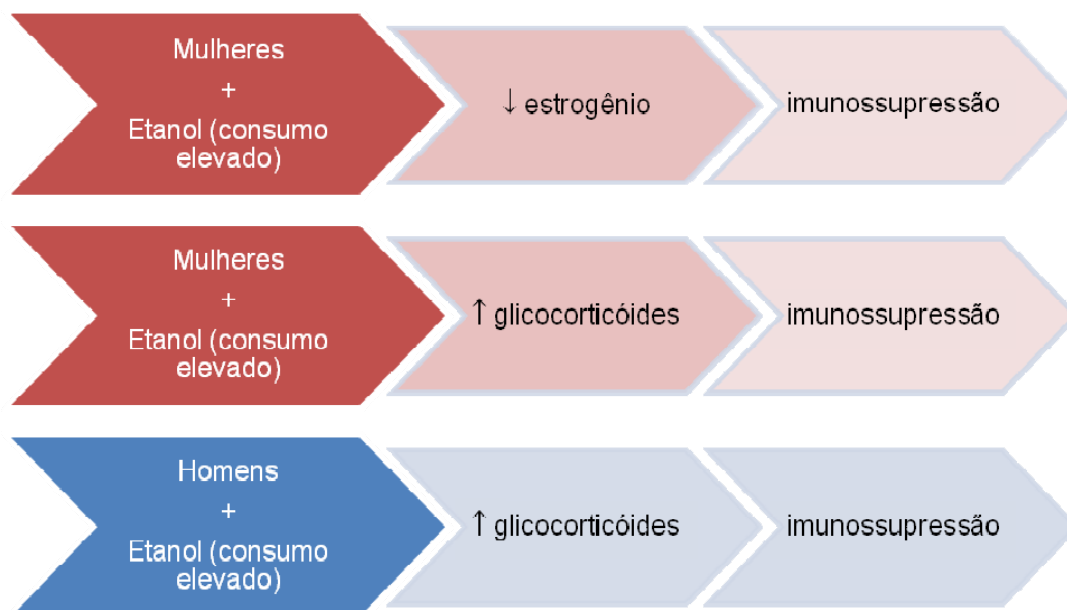


Figura 2 - Imunossupressão via hormônio-dependente induzida pelo etanol. Adaptação do esquema apresentado por Kovacs; Messingham (2002).

Considerando os dados obtidos por Zhu et al. (2007) em estudo com ratos alimentados com etanol ou solução isocalórica pareada, por três semanas, a complementação com vitamina E é capaz de proteger a função hipotalâmica-pituitária-gonadal dos efeitos deletérios do etanol. Os autores sugerem que este mecanismo de proteção ocorre via mediadores anti-inflamatórios e anti-oxidativos.

2.2 Contribuições da deficiência estrogênica e alcoolismo para a doença periodontal

2.2.1 Implicações da pós-menopausa no metabolismo ósseo

O tecido ósseo, assim como todas as estruturas biológicas, possui determinantes genéticos, ritmo de atividade metabólica/regenerativa e está sujeito a fatores externos com capacidade de induzir alterações patológicas em suas funções e estrutura. Sua diferenciação, quanto ao tamanho, se inicia na puberdade, tendo a testosterona importante função na atividade periosteal com potencial estimulador para ossos mais grossos e longos. Na mulher, o estrógeno parece desempenhar papel inibitório sobre a produção óssea mediada pelo periosteio e, portanto, na menopausa a atividade reprodutiva do periosteio aumenta, constituindo um mecanismo de defesa para atenuar a perda de massa óssea devido à maior reabsorção de osso trabecular (Thorne, 2004).

A presença de receptores estrogênicos nos osteoblastos, osteócitos e células osteoprogenitoras da medula óssea demonstram o papel do estrógeno para a regulação e remodelação óssea. O estrógeno inibe diretamente a reabsorção óssea, pela inibição da IL-6, prostaglandinas e fatores de crescimento (Cheschin, 2003).

De acordo com a literatura revisada por Faloni e Cerri (2007), o mecanismo do estrógeno sobre a remodelação óssea ainda não é conclusiva. Evidências mostram que o estrógeno atua sobre monócitos e linfócitos T (LT), reduzindo a síntese de IL-1 e TNF α , os quais por induzirem a secreção de IL-6, fator estimulador da colônia de macrófagos (M-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) promovem a fusão de células precursoras de osteoclastos. Também

observado que o estrógeno alterou a produção de proteases como catepsina K e metaloproteinase-9 (MMP-9) sintetizadas pelos osteoclastos. Portanto, o estrógeno diminui o processo de reabsorção por ação direta sobre osteoclastos.

A função ovariana é diminuída gradualmente após os trinta anos, com conseqüente redução nos níveis de estrógeno e inabilidade de responder as funções pituitárias. O último sangramento cíclico é denominado menopausa e a fase na qual as gônadas cessam sua função é chamada de climatério ou pós-menopausa. Em geral existe uma analogia para o climatério masculino e feminino, mas especialmente nas mulheres, a deficiência de estrógeno, em associação com fatores sistêmicos, aumenta o risco de desenvolvimento de várias patologias, dentre estas, distúrbios emocionais, infecções geniturinárias, doenças cardiovasculares, osteoporose e doença de Alzheimer. Patologias orais também são descritas como associadas ou modificadas pela menopausa, sendo citada a diminuição do fluxo salivar, patologias periodontais e auto-imunes como o pênfigo vulgar (Friedlander, 2002).

A osteopenia, por definição, é uma diminuição do tecido ósseo, enquanto que a osteoporose, uma osteopenia mais avançada, é caracterizada por uma progressiva e sistêmica perda de mineral e de matriz óssea, com um aumento a susceptibilidade à fratura. Tem como principais fatores relacionados às alterações endócrino-metabólicas (hereditárias ou não), reumatológicas, renais, digestivas, neoplásicas, hábitos como o fumo, o alto consumo de etanol e o uso de medicações como anticonvulsivantes e glicocorticóides, vida sedentária, pobre ingestão de cálcio e vitamina D. Os métodos de diagnóstico incluem o exame de densitometria óssea, um método de diagnóstico que expressa quantitativamente um conteúdo estimado de cálcio por área de superfície óssea e atualmente, os marcadores bioquímicos de remodelação óssea, os quais permitem a determinação na urina ou no sangue de substâncias

relacionadas com a produção ou reabsorção óssea (Friedlander, 2002; Thorne, 2004; Gomes-Filho et al. 2007).

A prevalência de osteoporose para adultos entre cinquenta e 64 anos é considerada maior para mulheres (em torno de 30-40%) que nos homens (em torno de 10%), aumentando com a idade, sendo que aproximadamente 60% das mulheres e 16% dos homens acima de 75 anos apresentam osteoporose. As hospitalizações devido às fraturas representam os mais altos custos, seguidas pelos medicamentos (WHO, 1999; Häussler et al., 2007, Edwards; Mioglorati, 2008).

A prevenção e tratamento de doenças que envolvem perda óssea, como osteopenia e osteoporose, tem se beneficiado de terapias de reposição hormonal, cálcio, vitamina D, bifosfonatos, ibandronatos e risedronatos. A retomada da atividade do estrógeno através da terapia de reposição hormonal (TRH) regulariza a atividade das células ósseas, sendo capaz de melhorar e aumentar a massa óssea do indivíduo (Edwards; Mioglorati, 2008).

De acordo com Iwaniec et al. (2008) a terapia com hormônio paratireoideano, por via subcutânea, é indicada para mulheres na pós-menopausa por acelerar a cicatrização de fraturas pelo estímulo de formação óssea e constitui a única medida terapêutica com capacidade comprovada para regenerar ativamente osso, aumentando a atividade osteoblástica em detrimento da atividade osteoclástica.

2.2.2 Implicações do alcoolismo no metabolismo ósseo

Conforme literatura revisada por Moe (2008), as anormalidades na homeostasia de cálcio, fósforo e magnésio podem ser desencadeadas por diferentes fatores, dentre estes a atividade intracelular de tecidos como rins, fígado e osso, especialmente pela ação de

dois hormônios, o paratireoidiano e a vitamina D. A regulação destes hormônios é diretamente influenciada pela presença de estrógeno, calcitonina, prolactina, fatores de crescimento, baixos níveis de cálcio e fósforo séricos. As alterações sistêmicas como anorexia, alcoolismo, diarreia crônica, hiperparatireodismo primário e leucemia alteram os níveis destes hormônios, influenciando diretamente no decréscimo dos níveis de cálcio, magnésio e fosfato e indiretamente em patologia ósseas, neurológicas e dermatológicas.

A patofisiologia da hipofosfatemia em alcoolista é multifatorial, geralmente relacionada à poliúria, dieta deficiente, êmese (ato de vomitar) e uso comum de antiácidos; também a cetoacidose ou deficiência de vitamina D podem levar a fosfaturia e subsequente hipofosfatemia. A hipomagnesia geralmente resulta da diminuição da reabsorção renal de magnésio e pobre dieta, estando esta frequentemente associada a hipocalcemia e hipofosfatemia. A hipocalcemia ocorre devido à êmese, disfunção gastrintestinal, com diminuição da absorção de cálcio pelo intestino e alterações nos níveis de vitamina D (Al-Sanouri et al., 2005).

Os efeitos diretos do etanol sobre as células responsáveis pela remodelação óssea e frequentemente osteopenia implicam em uma deficiência na deposição óssea dependente de osteoblasto e/ou por um excesso de reabsorção óssea dependente de osteoclasto. Tal consideração pode ser evidenciada quando Dai et al. (2000) compararam a diferenciação das células de medula de camundongos normais e de camundongos deficientes em IL-6 (a qual é indutora da osteoclastogênese) e quantificaram a densidade óssea mineral (DMO) de ossos da calvária e cauda, assim como a resposta da cultura celular de fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos e células da medula óssea para IL-6, estradiol, testosterona e etanol. Neste estudo foi observado que o etanol aumentou a expressão do RNAm de fator κ B receptor e ativador para osteoclastos (RANKL) nas células da medula óssea de animais IL-6

positivos, mas não nos animais deficientes de IL-6. Também se observou que o etanol alterou negativamente as características dos osteoblastos como morfologia e habilidade para a retenção de cálcio em ambos os animais e que culturas deficientes em IL-6 foram incapazes de acumular precursores de osteoclastos em resposta ao etanol.

Recentemente Himes et al., (2008) empregando análise transcriptômica (utilizada para monitorar a expressão genética via RNAm), identificaram em ratos, duas vias que regulam a remodelação óssea após o consumo abusivo do etanol: alteração na ativação das integrinas (as quais são essenciais para a reabsorção osteoclástica) e alteração na sinalização da via glicoproteica Wnt (que regula a diferenciação das células mesenquimais e promove a osteogênese). Verificou-se que o ibandronato, um aminobifosfonato utilizado no tratamento de osteopenia e osteoporose, normalizou a expressão de aproximadamente 20% destes genes.

Callaci et al. (2009) avaliaram por meio da análise transcriptômica e reação da cadeia de transcriptase-polimerase (PCR) a expressão genética para o processo de remodelação óssea na coluna vertebral de ratos quando associada ao etanol. Os autores observaram que a exposição ao etanol influenciava a expressão de genes que regulam o processo de formação óssea, nestes a osteocalcina e fosfatase alcalina estavam significativamente reduzidas, assim como a expressão de receptores para hormônio paratireoideano e proteínas morfogenéticas (os quais regulam osteoblastos) também se mostraram significadamente reduzidas. A expressão de reguladores da reabsorção óssea como esclerostina (a qual inibe a glicoproteína Wnt), RANKL e IL-6 estavam aumentada. Segundo os autores o etanol altera a remodelação e homeostasia óssea resultando no favorecimento do processo resorptivo.

Embora o alcoolismo tenha sido identificado como fator de risco no desenvolvimento da osteoporose o consumo de etanol, em baixa dosagem, não somente aumenta os níveis de aromatização (processo em

que ocorre a conversão de andrógenos em estrógeno) como diminui o metabolismo do estradiol proporcionando um efeito protetor às doenças decorrentes da menopausa, inclusive beneficiando a densidade óssea mineral. Este efeito é atribuído ao aumento endógeno nos níveis de estrógeno, a uma maior secreção de calcitonina e ao efeito antioxidante de bebidas como o vinho tinto. Em muitos casos, este benefício é perdido quando o consumo torna-se elevado. Para mulheres com TRH é hipotetizado que o consumo do etanol, independente da dosagem, tenha efeito sinérgico, aumentando os níveis de estrógeno e conseqüentemente os riscos de neoplasias (Epstein et al., 2007).

Considerando a interação entre o etanol e hormônio paratireoidiano, Iwaniec et al. (2008) pesquisaram o efeito do consumo de etanol (35% de calorias derivadas do etanol) e solução isocalórica ao etanol, durante seis semanas, sobre a resposta óssea avaliada em tíbias, ao tratamento com hormônio paratireoidiano em ratos (1µg/kg/d). Foi constatado que o etanol e a terapia proposta tinham efeitos opostos, sendo observado que o etanol inibiu a osteoindução e reduziu periosteó e formação de osso trabecular. Não foram observadas interações significativas entre o consumo do etanol e a terapia com hormônio paratireoidiano, contudo os benefícios desta terapia mostraram-se reduzidos quando associada ao etanol.

Em relação aos níveis aceitáveis para o consumo de etanol pelas mulheres, Gavaler et al. (2005) avaliaram 318 mulheres na pós-menopausa de diferentes raças e grupos étnicos e as dividiram em grupos experimentais conforme a dosagem do etanol consumido. Embora observadas diferenças de consumo para bebidas alcoólicas para as diferentes raças e grupos étnicos, os benefícios máximos quanto à estrogenização para mulheres na pós-menopausa foram promovidos com cinco taças por semana para todos os grupos raciais analisados. Segundo os autores, este benefício é particularmente importante quando o uso de estrógeno por TRH necessita ser diminuído substancialmente.

2.2.3 Considerações gerais sobre a doença periodontal

A periodontite é um processo inflamatório crônico complexo, multifatorial na qual interação entre os componentes do biofilme supra e subgingival e os mecanismos de defesa do hospedeiro, determinam o início e a progressão da doença. Clinicamente, a periodontite se caracteriza por inflamação dos tecidos de proteção e suporte dos dentes, ocasionando perda dos elementos de suporte dental, dentre estes o osso alveolar (Gaspersic et al., 2003; Kawai et al., 2006).

Em geral, o processo se inicia a partir do crescente acúmulo de microrganismos no biofilme supragengival, onde as alterações no microambiente do biofilme microbiano possibilitarão colonização de bactérias Gram-negativas. O desenvolvimento de uma microbiota periodontopatogênica e a continuidade do estímulo microbiano resultam em intensa carga antigênica no sulco gengival, que por sua vez ocasiona marcante resposta do hospedeiro (Niemi, 2008).

Várias células de defesa são ativadas pelo lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular de bactérias Gram-negativas, sendo que esta ativação surge, supostamente, pela interação de receptores de superfície dos queratinócitos do epitélio sulcular, atingindo o tecido conjuntivo, onde entram em contato com fibroblastos, células endoteliais e leucócitos. A interação dos produtos bacterianos com o epitélio induzem a expressão de moléculas de adesão e a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF α , interferon γ (IFN γ), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), quimiocinas, enzimas óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) e metaloproteinases da matriz extracelular (MMP). Clinicamente, essa fase inicial reflete alterações inflamatórias restritas ao periodonto de proteção, caracterizadas como eritema e edema da margem gengival, bem como perda de adesão tecidual e aumento do fluxo do fluido gengival. Microscopicamente as

alterações teciduais observadas incluem proliferação da camada basal do epitélio juncional, migração celular apical e lateral, vasculite dos vasos sanguíneos adjacentes ao epitélio juncional, destruição progressiva de fibras colágenas, alterações citopatológicas nos fibroblastos residentes e infiltrado inflamatório agudo (Gaspersic et al., 2003; Rodini, 2005).

A persistência da agressão possibilita contínuo estímulo antigênico, tornando a resposta inflamatória crônica, com proliferação do epitélio juncional abaixo da junção cimento-esmalte (JCE), formando uma bolsa periodontal, além da contínua degradação do colágeno, ativação de fibroblastos e fagócitos, acúmulo de células polimorfonucleares, intenso infiltrado mononuclear predominantemente linfoplasmocitário e perda de suporte dentário caracterizado pela reabsorção óssea alveolar (Rodini, 2005; Kawai et al., 2006).

Uma correlação positiva entre a ocorrência da doença periodontal e elevada resposta de anticorpos no soro para bactérias colonizadoras do fluido gengival, sugerem o envolvimento da resposta imune para múltiplas bactérias na fase inicial e subsequente da doença periodontal. Em geral, a resposta imune à bactéria é considerada ser uma resposta do hospedeiro protetora contra a bactéria patogênica (Gemmell et al., 2002).

O envolvimento de células imunes no curso da reabsorção óssea periodontal, de indivíduos com periodontite crônica, também foi demonstrado por Kawai et al. (2006), pela elevada expressão de RANKL e interleucina β (IL-1 β), estimulados por LT e, sobretudo linfócitos B (LB) presentes no fluido gengival e tecido gengival removido cirurgicamente. Neste contexto a presença de citocinas no processo de reabsorção óssea periodontal é dependente da diferenciação e ativação de osteoclastos e diretamente influenciada pela presença de mediadores como RANKL e citocinas pró-inflamatórias e pós-inflamatórias.

Quando a patologia periodontal encontra-se associada a fatores adquiridos, como o alcoolismo, com potencial efeito sobre a

remodelação óssea, ocorre modificações na resposta imune, com ativação de outras citocinas envolvidas com a reabsorção óssea como $INF\gamma$, interleucina 12 (IL-12) e interleucina 16 (IL-16), todas com capacidade, direta ou indireta, de estimular monócitos a produzir citocinas em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (Tsai et al., 2005).

Desta forma, as condições sistêmicas do hospedeiro, podem determinar um maior ou menor risco de desenvolvimento de periodontite. Essas condições sejam adquiridas, congênitas ou hereditárias determinam o resultado final do processo da doença periodontal, modulando a resposta inflamatória, assim como determinam uma enorme variação em relação à susceptibilidade individual à doença periodontal (Paquette, 1999; Kinane; 1999; Rodini, 2005).

2.2.3.1 Alcoolismo e osteoporose como indicadores de risco para doença periodontal

Uma variedade de fatores que interferem na progressão da periodontite tem sido revisada, incluindo conceitos como fatores de risco e indicadores de risco (Genco, 1996).

Considerando a etiologia multifatorial e progressão da doença determinou-se que existe uma relação bidirecional entre a periodontite e doenças sistêmicas (Paquette, 1999). Neste contexto, novos conceitos foram incorporados em relação à etiologia, patogenia e terapêutica da doença periodontal, assim como surgiram terminologias próprias como fatores de risco associados à doença periodontal (Kinane, 1999).

É considerado fator de risco, o atributo ou circunstância do ambiente ou característica do indivíduo herdada ou adquirida, associada à maior probabilidade deste mesmo indivíduo apresentar no

futuro, um dano à saúde. Os fatores de risco para a doença periodontal atuam na sua iniciação e progressão e constituem importantes componentes individuais a serem considerados na etapa de prevenção, tratamento e manutenção. Dentre os fatores de risco conhecidos destacam-se o hábito de fumar e o *diabetes mellitus*. Por outro lado, indicadores de risco são fatores de risco em potencial, ou seja, podem alterar o curso da doença, contudo ainda não foram confirmados por estudos longitudinais (Genco, 1996; Paquette, 1999).

Importantes indicadores de risco para a doença periodontal incluem osteopenia associada com deficiência estrogênica, gênero (tendo os homens maior prevalência de periodontite que as mulheres), idade (com a maior prevalência acima dos cinquenta anos) e fatores hereditários. Outros fatores ainda permanecem em estudo, mas são todos, de um modo geral, considerados menos significativos para a doença periodontal que o fumo e o *diabetes* (Albandar, 2002).

2.2.3.2 Considerações sobre osteoporose e doença periodontal

Alguns estudos sugeriram a existência de uma correlação entre a redução da densidade óssea esquelética, a diminuição do volume ósseo alveolar e a perda de inserção periodontal (Tanaka et al., 2003; Anbinder et al., 2006; Amadei, 2007; Gomes-Filho, 2007).

Segundo dados revisados por Edwards e Migliotati (2008) a osteoporose e a doença periodontal possuem fatores/indicadores de risco em comum como o fumo, idade avançada, distúrbios para a absorção de cálcio e vitamina D e, muitas vezes a falta de habilidade para a higienização bucal e medicação usada por pacientes com osteoporose implicam no favorecimento da xerostomia e doença periodontal.

A correlação direta da osteoporose com a doença periodontal, ainda não comprovada, foi estudada por Lopes et al. (2008), durante avaliação de 47 mulheres na pós menopausa acima dos cinquenta anos de idade e divididas de acordo com a DMO da área lombar em osso normal, osteopênico e osteoporótico. Segundo os autores, não foi detectada correlação significativa para os parâmetros periodontais como Índice gengival, índice periodontal e nível clínico de inserção e a condição óssea sistêmica.

Gomes-Filho et al. (2007) sugeriram que esta correlação pudesse ser influenciada por fatores externos. Considerando fatores como idade, raça, nível educacional, atividade física, hábitos como fumo e consumo de etanol e medicamentos, os autores avaliaram 139 mulheres brasileiras acima de cinquenta anos na pós-menopausa (destas 48 com doença periodontal e 91 sem doença periodontal). Foi percebido que a proporção de mulheres com diagnóstico de osteoporose e doença periodontal foi maior quando estas tinham menos de quatro anos de escolaridade, relação esta, não observada para aquelas sem osteoporose. Segundo os autores o nível educacional determina como o indivíduo se incorpora na sociedade e provavelmente implica em seus cuidados pessoais, os quais associados à baixa DMO favorecem a doença periodontal. Foi considerado que, dada à natureza multifatorial da doença periodontal a osteoporose poderia ser identificada não como um fator etiológico inicial, mas podendo afetar o curso da doença pela modificação da trabécula óssea, principalmente se considerada a arcada inferior, onde a osteoporose se mostra mais prevalente.

Uma hipótese sugerida seria que a osteopenia estaria relacionada com a perda da crista óssea alveolar (COA) pós-menopausa. Este osso trabecular, apresentando menor densidade, poderia ser mais rapidamente absorvido e esta remodelação poderia ser potencializada quando presente a infecção periodontal (Cheschin, 2003).

Com o propósito de verificar se a deficiência estrogênica era um fator de risco para a doença periodontal, Anbinder et al. (2006) avaliaram radiograficamente a perda de suporte ósseo e macroscopicamente a perda óssea na região de furca do segundo molar superior, em ratas ovariectomizadas (OVZ) com a doença periodontal induzida por meio de ligadura, durante cinco semanas. Animais submetidos a simulação cirúrgica de castração (SHAM) foram utilizados como controle. No modelo proposto não foram evidenciadas alterações significativas para as ratas com deficiência estrogênica.

Tanaka et al. (2003) constataram, por meio de histomorfometria e tomografia computadorizada, que o volume, número e espessura das trabéculas do osso mandibular foram significativamente menores para ratas OVZ em relação as ratas SHAM. As alterações mostraram-se mais acentuadas logo após a ovariectomia, diminuindo gradativamente com o tempo, mas presentes mesmo um ano após da ovariectomia.

Em relação ao tempo necessário para avaliação dos efeitos decorrentes da deficiência estrogênica no periodonto de ratas, Amadei (2007) avaliou radiográfica, morfométrica e histometricamente, os efeitos de diferentes tempos de deficiência estrogênica (30, 60, 90 e 120 dias) na perda óssea resultante da periodontite induzida por meio de ligadura, durante trinta dias, em ratas OVZ. Observou-se para todas as análises que ratas ovariectomizadas, com doença periodontal induzida, apresentaram significativa perda óssea na região de furca em relação ao grupo SHAM quando o período de deficiência hormonal foi de noventa dias, sendo sugerido este período experimental como o ideal para avaliação da doença periodontal.

Considerando que a deficiência de estrogênio estimula a reabsorção óssea e que as citocinas envolvidas com a osteoporose e com a doença periodontal são similares, Fujita et al. (2008) avaliaram a resposta da cultura celular de camundongos fêmeas OVZ e SHAM, ao

estímulo pelo LPS de *Porphyromonas gingivalis* e *Escherichia coli*. Para tanto foram realizadas culturas de osteoclastos, osteoblastos, células da medula óssea. Os autores observaram, nos animais ovariectomizados, significativo aumento de osteoclastos e da expressão de RNAm RANKL (essencial para a diferenciação dos osteoclastos) e diminuição de IFN γ (interfere na ação do RANKL, modulando a resposta resorptiva) quando comparados a animais SHAM.

Analisando os aspectos comuns à patogênese de ambas as condições, Duarte et al. (2004) avaliaram o impacto da deficiência estrogênica e os efeitos da reposição de estrogênio ou calcitonina na perda óssea na região de furca, resultante da periodontite experimental. Após 21 dias das cirurgias OVZ ou SHAM, a doença periodontal foi induzida por seis dias, por meio de ligadura, no primeiro molar, sendo o dente contralateral utilizado como controle. A análise macroscópica do volume uterino, o monitoramento do ciclo estrogênico e os níveis de fosfatase alcalina confirmaram o sucesso da ovariectomia. Observou-se perda óssea significativa para animais ovariectomizados mesmo na ausência da doença periodontal induzida a qual foi restabelecida pela reposição estrogênica, mas não pela calcitonina. Na presença da doença periodontal a deficiência estrogênica resultou em uma significativa perda óssea, mas nenhum dos tratamentos foi capaz de proteger a perda óssea periodontal.

Quando Spalding (2005) avaliou, macroscópica, radiográfica e histologicamente os efeitos de diferentes momentos para o início da reposição hormonal estrogênica na evolução da periodontite induzida em ratas ovariectomizadas e controle SHAM, foi observado que a deficiência estrogênica decorrente da ovariectomia, não alterou significativamente o osso alveolar da região de furca dos segundos molares superiores maxila. Também foi verificado que a terapia de reposição hormonal estrogênica não retardou a progressão da periodontite induzida.

Outra possibilidade terapêutica, a terapia com hormônio paratireoidiano (THP) foi proposta e avaliada por Marques et al. (2005) como tendo possível efeito protetor para periodontite induzida em ratas OVZ. Os autores avaliaram a densidade óssea mandibular, perda óssea na região da furca e característica das trabéculas ósseas da tíbia. Foi constatada significativa osteopenia na mandíbula e tíbia para animais ovariectomizados e perda óssea na região da furca para ambos os animais SHAM e OVZ com periodontite induzida em relação a animais sem a THP. De acordo com os resultados obtidos a THP, administrada de forma intermitente, apresentou efeitos benéficos para a prevenção da osteopenia observada na tíbia e nos sítios periodontais.

De acordo com os dados revisados por Liu et al. (2009) a THP funciona como a melhor opção para mediar a remodelação óssea. Quando administrada de forma intermitente possui efeitos anabólicos com promoção de formação óssea.

2.2.3.3 Considerações sobre alcoolismo e doença periodontal

A identificação de pacientes alcoolistas na Odontologia é dificultada e muitas vezes o consumo agudo não é percebido, pois o paciente pode estar em abstinência. Para os usuários crônicos do etanol, além das patologias sistêmicas e deficiência nutricional geralmente relacionada, normalmente existe uma inadequada higiene oral e ausência de retornos odontológicos regulares. Algumas das condições clínicas que evidenciam e reforçam a suspeita para o alcoolismo são erosão dental associada à regurgitação, doença periodontal, glossite, queilite e hipertrofia bilateral da parótida (Schreiber, 2001).

Com o propósito de verificar a influência do consumo abusivo do etanol na saúde bucal, Jansson (2008) investigou clínica e

radiograficamente a condição bucal de 477 indivíduos que consumiram bebidas alcoólicas. Os dados odontológicos incluíram número de dentes, restaurações dentárias, presença de cáries e condição periodontal determinada pelo nível ósseo interproximal clínico e radiográfico mensurado em todos os dentes. Segundo este estudo, o consumo diário acima de cinco centilitros estava significativamente relacionado com presença de cáries, lesões apicais e cálculo, no entanto não foi observada nenhuma evidência significativa de associação com a doença periodontal, sendo provável que os fatores relacionados ao estilo de vida adotado e visitas irregulares ao dentista possam ter influenciado a condição bucal observada.

Neste mesmo sentido, Pitiphat et al. (2003), realizaram estudo prospectivo com 51529 homens considerados saudáveis, entre quarenta e 75 anos. Neste, foi avaliado, por meio de questionário semi-quantitativo auto-relatado, o consumo de bebidas alcoólicas no ano anterior e o conhecimento da presença de doença periodontal, com perda óssea, diagnosticada por meio de mensuração clínica. Observou-se uma associação positiva entre o consumo do etanol e a ocorrência de periodontite, representando um risco aumentado de 18 a 27% em consumidores de bebidas alcoólicas em relação a não consumidores. Entretanto, não foi observada uma associação específica para o tipo de bebida alcoólica e o risco de periodontite.

Para Yoshiara et al. (2008) a presença de cárie e doença periodontal, asseguradas respectivamente por exame clínico das faces radiculares expostas e exame periodontal do nível de inserção clínica estavam associadas a dietas específicas, sendo que o consumo de vegetais cítricos mostrou-se negativamente relacionado com a doença periodontal (-0,16; $p=0,001$) e o consumo de derivados de leite negativamente relacionado à cárie radicular (-0,14; $p=0,035$). Uma relação de correlação positiva para a doença periodontal foi observada para o

consumo de etanol (0,11; $p=0,042$), cereais/doces confeitados (0,10; $p=0,041$) e número de dentes remanescentes (0,58; $p<0,001$).

Segundo Amaral et al. (2008) existe uma relação entre a dependência alcoólica e a doença periodontal, a qual está associada com a profundidade de sondagem e nível de inserção clínica. Tal afirmação pode ser constatada em estudo seccional cruzado entre 49 alcoolistas e 49 não alcoolistas (idade entre trinta e sessenta anos, dependência alcoólica de $25,83 \pm 10,53$ anos, sendo os grupos balanceados para o consumo do tabaco) onde foram avaliados critérios sociodemográficos e parâmetros periodontais como biofilme visível, presença de sangramento a sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica.

Quando a avaliação para a relação entre o consumo moderado do etanol e nível de inserção clínica, considerados para caucasianos, foi ajustada para variáveis específicas como gênero e tipo de bebida alcoólica, Kongast et al. (2008) verificaram que para homens, a relação entre o consumo do etanol moderado (21 a 34 doses/semana) a intenso (mais de 35 doses/semana) e o nível de inserção clínica eram inversamente proporcionais, enquanto que, nenhuma associação significativa foi observada para mulheres. Em relação ao tipo de bebida, o consumo de mais de 14 taças de vinho/semana estava inversamente associado à perda de inserção clínica observada em homens, também nenhuma associação foi observada para mulheres. Segundo os autores, os resultados não suportaram a hipótese que a periodontite estivesse associada a um consumo específico para bebidas alcoólicas.

Em relação aos estudos realizados em animais, onde se consegue maior controle com variáveis como tipo, dosagem e frequência do consumo alcoólico e controle nutricional, Souza (2006) observou macroscópica e histologicamente, o periodonto de ratos mantidos com dieta contendo solução de álcool etílico a 20% ou solução isocalórica, ministradas por oito semanas e sua implicação quando combinados com a periodontite induzida por ligadura. Os resultados demonstraram que o

nível ósseo avaliado macroscopicamente e, área correspondente ao ligamento periodontal e perda óssea na região de furca, avaliados histomorfometricamente, foram significativamente alterados quando a periodontite estava combinada com etanol 20% em relação ao periodonto sem doença periodontal ou dieta isocalórica.

Irei et al. (2008) também avaliaram os efeitos periodontais para o consumo do etanol (36% de calorias) e dieta isocalórica considerando parâmetros como histomorfometria da distância entre a JCE à COA e a posição mais apical do epitélio juncional, contagem de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), detecção imunohistoquímica dos níveis de FNT- α , avaliação do estado oxidativo para amostras de biópsia gengival por meio de imunoensaio e avaliação dos níveis de hidroperóxido no sangue. Foi possível observar que, de um modo geral, os parâmetros analisados estavam significativamente alterados no grupo etanol sem combinação com a doença periodontal em relação ao grupo controle também não combinado a doença periodontal e quando associado a doença periodontal não induzia danos tão significativos em comparação ao grupo combinado isocalórico.

2.3. Considerações para a doença periodontal experimental em ratos

Ao contrário de outras doenças infecciosas humanas, que não tem correspondentes em outras espécies, a doença periodontal é comum em animais de pequeno porte e representa um grande problema para a medicina veterinária, pois acarreta numerosas conseqüências locais e sistêmicas (Niemic, 2008).

Diferentes do estudo em humanos, os modelos animais podem ser utilizados para se avaliar a patogênese ou mesmo as modalidades terapêuticas com relação à doença periodontal, permitindo

pesquisas de baixo custo, fácil manuseio e disponibilidade de variação controlada de condições fisiológicas, microbiológicas e imunológicas (Kuhr et al., 2004; Rodini, 2005, Gaspersic et al. 2008)

A anatomia da junção dentogengival da região de molares do rato é muito semelhante àquela descrita no homem, tornando o estudo experimental da doença periodontal inflamatória nestes animais bastante válida (Souza et al., 2005).

Em ratos, a periodontite pode ser induzida por diferentes métodos como a administração de uma dieta rica em sacarose, a inoculação experimental de microrganismos periodontopatogênicos ou de seus produtos ou a indução por fio de algodão posicionado na margem gengival, também chamada de indução por ligadura (Gemmel et al., 2002; Rodini, 2005).

Algumas das bactérias periodontopatogênicas que podem ser utilizadas na indução da doença experimental em ratos são *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum*. Pode-se ainda inocular o tecido gengival com LPS, visando estimular a liberação de mediadores inflamatórios os quais induzirão processo inflamatório e ativação osteoclástica (Gemmel et al., 2002).

Na doença periodontal induzida por meio da colocação de ligadura ao redor da região cervical do molar, geralmente o primeiro molar inferior e/ou o segundo molar superior são eleitos como sítios favoráveis a esta técnica (Kuhr et al., 2004; Souza, 2006; Amadei, 2007; Gaspersic et al., 2008).

Com este modelo há uma resposta a agressão mecânica provocando achatamento e deslocamento dos tecidos gengivais mesial e distal, bem como redução da integridade tecidual pela ulceração causada no epitélio juncional. O acúmulo gradual de biofilme associado à ruptura da integridade tecidual propicia a migração de bactérias em direção aos

tecidos mais profundos, gerando processo inflamatório periodontal, que é geralmente caracterizado por períodos de inflamação aguda, com migração de células inflamatórias, especialmente PMN, seguidos por perda de tecido conjuntivo e períodos de inflamação crônica, caracterizando a instalação da doença periodontal (Rodini, 2005).

A avaliação histológica é citada por muitos estudos como método de grande sensibilidade para se determinar, em ratos, as alterações ósseas periodontais. Também outras formas de avaliações são sugeridas, entre estas avaliações macroscópicas e radiológicas, as quais consideram nível ósseo alveolar e DMO do osso alveolar (Tanaka et al. 2003; Marques et al., 2005; Amadei, 2007).

Segundo Souza et al. (2005) a avaliação morfométrica do osso alveolar de ratos Wistar, realizada em peças dissecadas com lupa estereoscópica, para faces livres, permite a medida linear da JCE a COA de todos os elementos da região e quantificação da perda óssea horizontal. Já o método radiográfico, quantifica perda óssea proximal, onde se realiza a medida da JCE a COA na mesial ou distal do dente envolvido. Estes métodos são reproduzíveis e complementares e permitem estimar a perda óssea observada na doença periodontal.

Fernandes et al. (2007) compararam os procedimentos de medida morfométrica, realizada em osso seco e histométrica, realizada em cortes histológicos, realizada da JCE a COA observada na proximal de segundos molares superiores esquerdos com doença periodontal induzida por meio de ligadura ou controle, onde a doença periodontal não foi induzida. Os autores observaram que ambas as técnicas foram satisfatórias para a avaliação linear da perda de inserção e que não houveram diferenças estatísticas entre os procedimentos de avaliação.

Outros estudos propuseram a avaliação de tecidos moles como tecido gengival e tecidos adjacentes envolvidos com o processo infecto-inflamatório presentes na doença periodontal (Galvão et al., 2003; Liu et al., 2006; Gaspersic et al., 2008).

Galvão et al. (2003) observaram alterações no comportamento inflamatório periodontal dos animais com indução da doença periodontal por meio de ligadura e dieta rica em sacarose por um período de trinta dias. Os autores propuseram a dicotomização dos dados de acordo com a característica histológica em dois grupos, com ou sem a inflamação periodontal e, posteriormente a análise fatorial de correspondência como ferramenta para estudos descritivos da doença periodontal induzida em ratos. Foi observado que a análise de correspondência permitiu mostrar a distribuição do processo inflamatório, sendo considerada pelos autores com um bom método para analisar variações histológicas. Para o estudo proposto, a doença periodontal induzida foi capaz de promover processo inflamatório crônico independente da dieta ministrada.

Liu et al. (2006) observaram a perda óssea, perda de inserção, inflamação e reparo periodontal em modelos de ratos com doença periodontal induzida por ligadura e *diabetes* tipo II. Como método proposto os autores avaliaram a distância linear interproximal da JCE à COA para a perda óssea, a distância entre JCE a parte coronária do tecido conjuntivo aderido ao cimento para avaliação da perda de inserção e, a presença e quantidade de células inflamatórias (PMN e mononucleares) como índice inflamatório. O método de marcação histoquímica TRAP (*Tartrate-resistant Acid-phosphatase-stained*) foi utilizado para avaliação dos processos ósseos resorptivos e formativos junto ao osso interproximal e células adjacente ao osso como fibroblastos e osteoclastos. Os autores observaram que o diabetes causa resposta inflamatória periodontal mais persistente, maior perda de inserção e perda óssea assim como deficiente reparo ósseo, possivelmente afetado pelo maior número de apoptose fibroblástica.

Gaspersic et al. (2008) investigaram a influência da doença periodontal induzida por ligadura e a expressão de substâncias neuropeptídeas, presentes em condições inflamatórias, no gânglio

trigeminal ipsilateral e contralateral, por meio de análise imunoistoquímica. Os autores verificaram que existe uma resposta contralateral para a condição inflamatória induzida, quando comparada com o controle, a qual pode ser explicada pela resposta inflamatória sistêmica e indução de citocinas mediada pela doença periodontal e possivelmente, mecanismos reflexivos envolvendo regiões do sistema nervoso central, também denominada eixo neuro-imune.

A respeito da inflamação crônica bilateral no periodonto e conseqüente perda óssea, El-Aleem et al. (2004) já haviam observado que a doença periodontal induzida por injeção LPS adjacente ao segundo molar inferior direito refletia no aumento de neuropeptídeos, como substância P e peptídeo gene-relacionados à calcitonina, em ambos os gânglios trigeminais direito e esquerdo. Segundo as observações feitas pelos autores, em relação ao comportamento bilateral, foi plausível acreditar que a inflamação periodontal em ratos apresentava um mecanismo neurogênico, o qual poderia ter sido influenciado pelas alterações na dieta e peso induzidas pelo processo inflamatório oral.

Em relação ao processo inflamatório periodontal, deve ser observado que para humanos o infiltrado inflamatório periodontal crônico é intenso e predominantemente linfoplasmocitário, apresentando distribuição focal. Já os estudos envolvendo o processo inflamatório em ratos observaram um comportamento distinto para a composição e localização do infiltrado inflamatório (Gaspersic et al., 2003; Rodini, 2005; Kuhr et al., 2004).

Gaspersic et al. (2003) observaram o processo de inflamação e perda de inserção periodontal para o modelo de periodontite induzida por ligadura em ratos, durante 16 dias e a influência do TNF α sistêmico, aplicado por administração subcutânea. Neste estudo a perda de inserção periodontal compreendia a medida linear entre a JCE e a porção mais coronária do epitélio juncional e a reação inflamatória presente na área interproximal foi avaliada, morfométrica e

histologicamente, pela mensuração da área do tecido conjuntivo infiltrado por células inflamatórias. Foi observado que a periodontite induzida apresentava moderado quadro inflamatório e perda de inserção, com o foco inflamatório separado da crista alveolar por uma área não infiltrada, com fibras colágenas intactas. A presença de TNF α ampliava a resposta inflamatória nos sítios com doença periodontal, sendo observado vasodilatação, infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo composto por linfócitos, poucos PMN e degradação das fibras colágenas supra-cristais.

Rodini (2005) observou em cortes histológicos, que a periodontite induzida por ligadura induz abundância de PMNs já no início da doença. Foi observado nas primeiras 24 horas um intenso infiltrado inflamatório mononuclear, difuso e predominantemente subepitelial o qual apresenta gradativa redução até os períodos mais tardios de 56 dias, havendo uma diminuição gradativa da inflamação. Verificou-se uma estagnação da perda óssea alveolar a partir de 42 dias da indução da doença quando da utilização de ligaduras. Segundo a autora, isso ocorre possivelmente pela reabsorção óssea, a qual deixa a ligadura disposta mais coronariamente ao longo do tempo.

Kuhr et al. (2004) observaram o modelo de doença periodontal induzida em ratos por meio de ligadura por 60 dias. Segundo os autores este modelo é mais indicado para experimentos em curto prazo (preferencialmente 15 dias), sendo a resposta inflamatória mais significativa do dia 1 ao dia 15, diminuindo gradativamente, porém foi notada perda óssea gradativa até os sessenta dias do experimento.

Rodini et al. (2008) avaliaram em amostras gengivais, por meio de PCR, a expressão de MMP-2 e -9 e óxido nítrico sintetase (NOs) em diferentes períodos da periodontite induzida por ligaduras em ratos. Os autores observaram, no terceiro dia, significativa expressão de MMP-9 e NOs para os sítios com doença periodontal induzida em relação aos sítios contralaterais, os quais coincidiam com o início da perda óssea alveolar. Após sete dias de indução, somente a MMP-9 apresentava

significativa expressão, sendo sugerido que, para este modelo de doença periodontal, a MMP-9 e NOs participam nos estágios precoces e podem estar relacionados a exuberante presença de PMN observada ao terceiro dia de indução.

Deve ser considerado para estudos de periodontite induzida por ligadura, em modelos com ratos, que a perda óssea periodontal é diretamente dependente da idade do animal (Kuhr et al., 2004). Também é relevante o fato de que com a atrição interproximal, os molares inclinam-se distalmente, assim como o osso interproximal é estreitado, resultando em uma constante remodelação do osso alveolar (Rodini, 2005).

3 PROPOSIÇÃO

Este estudo propôs avaliar histomorfometricamente a influência do consumo de etanol na periodontite induzida em ratas com deficiência estrogênica e caracterizar os aspectos histopatológicos dos tecidos periodontais nas diferentes condições experimentais.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo está de acordo com os Princípios Éticos para a Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), conforme solicitação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOSJC-UNESP), protocolo número 001/2007 CA/CEP (Anexo A).

4.1 Animais

Para este trabalho foram utilizadas sessenta ratas (*Rattus norvegicus*, variação *albinus*, *Wistar*) com três meses de idade, com peso corpóreo em média de 300g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP e mantidos em gaiolas em temperatura ambiente, alimentados com dieta sólida e líquida controladas, dependendo do grupo experimental.

4.1.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com a cirurgia ou a simulação cirúrgica de castração, sendo:

- a) Grupo SHAM: fêmeas submetidas à simulação cirúrgica de castração;

b) Grupo OVZ: fêmeas castradas ou ovariectomizadas;

Cada grupo foi dividido em três subgrupos. Os subgrupos experimentais foram denominados C, A e I de acordo com a dieta ministrada, sendo:

- a) Subgrupo C: animais com dieta controle (água e ração);
- b) Subgrupo A: animais com dieta alcoólica (solução de etanol 20%) e ração;
- c) Subgrupo I: animais com dieta controle nutricional isocalórico – dieta líquida contendo sacarose e ração com as mesmas calorias médias ingeridas na véspera pelo grupo A;

As Figuras 3 e 4 definem os grupos experimentais

GRUPO SHAM (n=30)

C – dieta controle, ratas SHAM que receberam água e ração (n=10);

A – dieta alcoólica 20%, ratas SHAM que receberam solução de etanol a 20% e ração (n=10);

I - dieta controle nutricional isocalórico – ratas SHAM que receberam solução de sacarose e ração com as mesmas calorias médias ingeridas na véspera pelo grupo A (n=10);

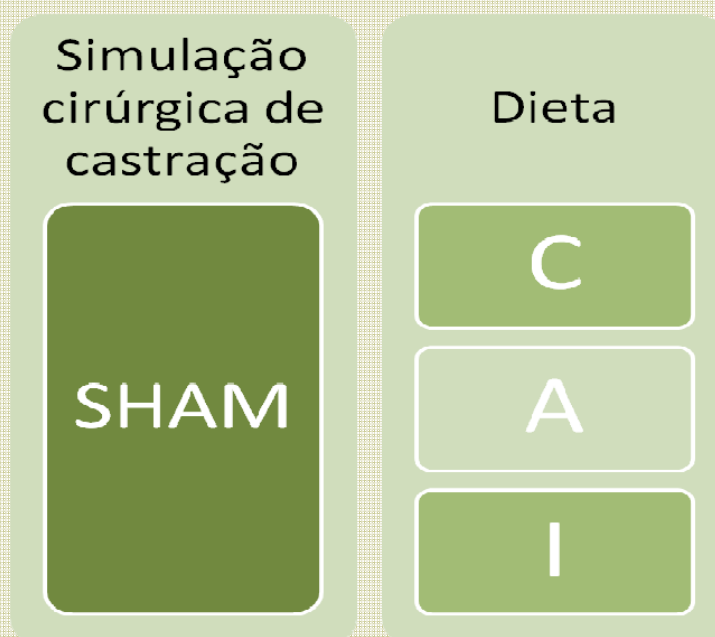


Figura 3 – Distribuição do grupo experimental SHAM em função da dieta controle, alcoólica e isocalórica. SHAM = ratas não castradas submetidas à simulação cirúrgica de ovariectomia.

GRUPO OVZ (n=30)

C – dieta controle, ratas OVZ que receberam água e ração (n=10);

A – dieta alcoólica 20%, ratas OVZ que receberam solução de etanol a 20% e ração (n=10);

I - dieta controle nutricional isocalórico – ratas OVZ que receberam solução de sacarose e ração com as mesmas calorias médias ingeridas na véspera pelo grupo A (n=10);

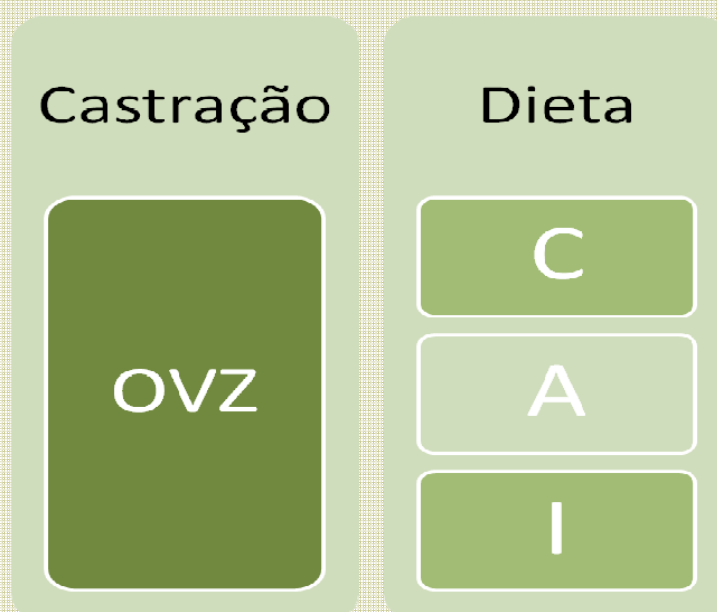


Figura 4 – Distribuição do grupo experimental OVZ em função da dieta controle, alcoólica e isocalórica. OVZ = ratas submetidas à simulação cirúrgica de ovariectomia.

4.2 Sistemática de realização do experimento

4.2.1 Castração dos animais

Com o objetivo de avaliar a influência hormonal associada ao consumo crônico do etanol, os animais, ao completarem noventa dias, foram divididos aleatoriamente em dois grupos, sendo trinta ratas castradas (OVZ) e trinta ratas que receberam simulação cirúrgica (SHAM).

Após anestesia, com solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Anasedan - Bayer do Brasil), substância com propriedades sedativa, analgésica e relaxante muscular e de Ketamina base (Dopalen – Agribands do Brasil LTDA), anestésico geral, nas respectivas proporções de 0,8mL/0,5mL na dose de 0,1mL/100gr, via intramuscular, os animais foram depilados na região abdominal lateral, a qual foi previamente desinfetada com álcool iodado. Uma incisão longitudinal com extensão aproximada de 1cm foi realizada na área eleita, próxima ao nível dos rins e abaixo da última costela; o ovário foi identificado e exposto. Com a finalidade de se realizar uma hemostasia local, foi realizada uma amarra logo abaixo do ovário, por meio da ligação da parte superior da trompa com o fio de seda nº4 (Ethicon/Johnson & Johnson - São José dos Campos). O ovário foi removido juntamente com a gordura circundante e pequena porção do útero. Ao final dos procedimentos, a camada muscular foi suturada com fio de sutura absorvível Catgut nº4 (Cirumédica - Cotia, SP, Brasil) e a pele com fio de seda nº4 (Ethicon/Johnson & Johnson - São José dos Campos). Os procedimentos foram realizados bilateralmente (Figura 5).

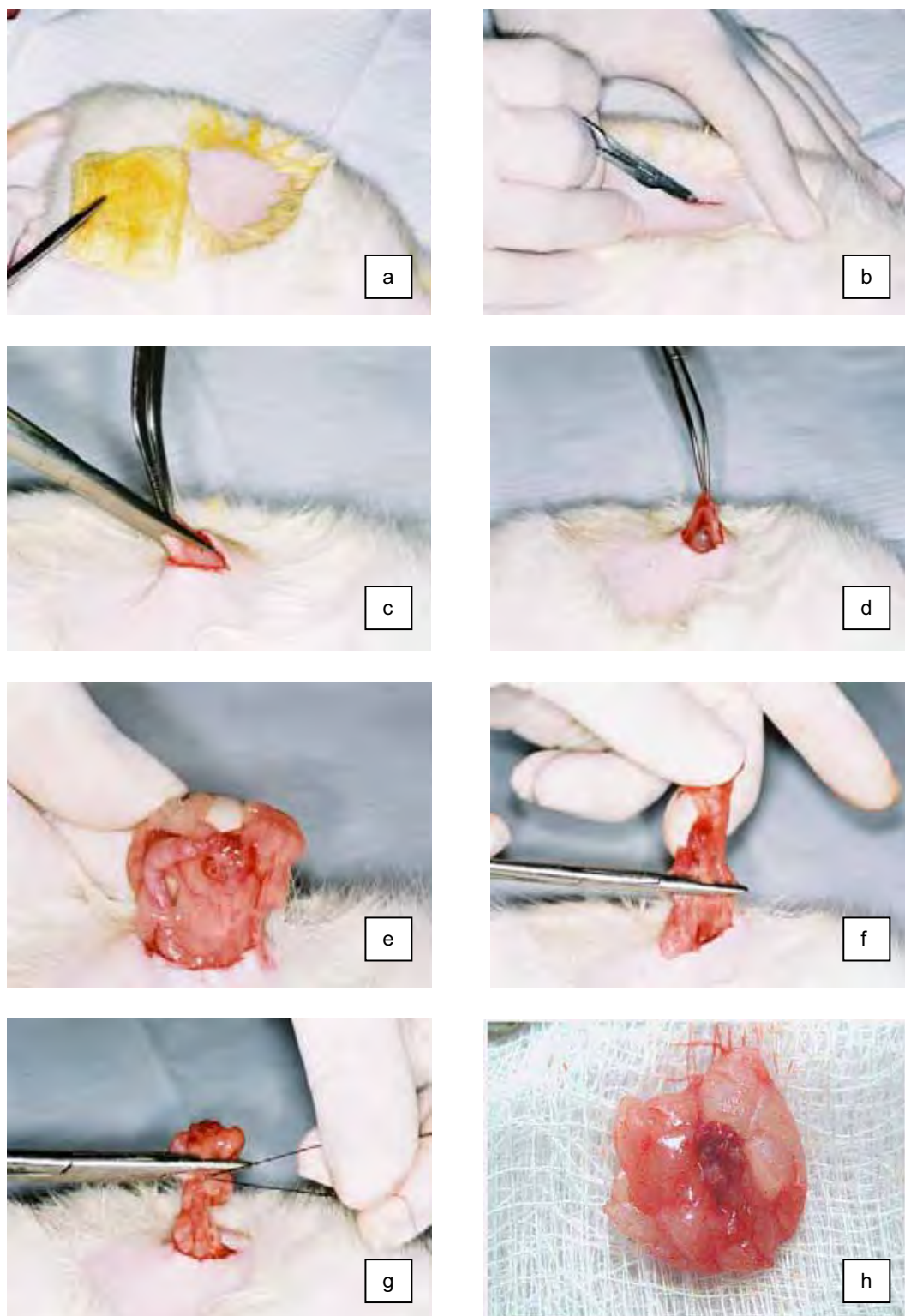


Figura 5 - Ovariectomia: a) anti-sepsia local; b) incisão na derme; c) incisão muscular; d) localização do ovário; e) exposição do ovário e trompa; f) pinçamento; hemostasia com fio de algodão; excisão do ovário e gordura circundante.

4.2.2 Simulação cirúrgica (SHAM)

A fim de submeter todo o grupo experimental ao estresse cirúrgico, o grupo não castrado recebeu os mesmos procedimentos que o castrado por ovariectomia, no entanto, não foi efetuada a amarração abaixo do ovário, nem a incisão do mesmo, sendo que este apenas foi manipulado e reposicionado.

4.2.3 Dieta

A dieta experimental seguiu a proposta de Lieber et al. (2003), Rocha (2005) e Souza (2006). A mesma foi iniciada após trinta dias da cirurgia de castração ou simulação cirúrgica onde foram administradas, soluções preparadas diariamente conforme grupo experimental.

4.2.3.1 Dieta líquida

Os animais do subgrupo A receberam 50 mL de solução alcoólica 20% por animal (álcool etílico ABS. ACS-99,5^o - Ecibra, Santo Amaro, São Paulo). No dia seguinte a solução restante foi medida, sendo registrada a média ingerida.

O subgrupo I foi instituído com a finalidade de diferenciar o efeito direto e indireto do etanol, visto que o consumo crônico do etanol leva a um quadro de desnutrição, assim o grupo isocalórico serviu como controle nutricional simulando a provável deficiência de nutrientes

instituída no subgrupo A (Lieber, 2003). Neste propósito, no dia seguinte da dieta do grupo A, em que as médias de consumo eram obtidas, uma solução de sacarose P.A. (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro) com as mesmas calorias da solução alcoólica foi preparada e fornecida aos grupos isocalóricos correspondentes.

Para subgrupo C a dieta foi livre o que correspondeu ao fornecimento de 160 mL de água por animal. Para todos os subgrupos a solução restante foi medida diariamente, sendo registrada a média ingerida. As dietas foram administradas por oito semanas.

4.2.3.2 Dieta sólida

Para o subgrupo A foram fornecidos 50g de ração Nutrilabor (Guabi, Campinas-SP) diariamente por animal. No dia seguinte as porções restantes foram pesadas e obtidas a quantidade média de ração ingerida, a qual foi fornecida para os animais do subgrupo I. O subgrupo C teve dieta livre, o que correspondeu a 160g de ração por animal. Para todos os subgrupos foram registradas as quantidades médias consumidas. A dieta sólida também seguiu por oito semanas.

4.2.4 Indução da doença periodontal

A indução da periodontite foi realizada, após trinta dias da castração, juntamente com o início das dietas experimentais, por meio da colocação de ligadura de algodão, procedimento no qual a cervical do dente primeiro molar inferior esquerdo foi envolvida com duas voltas de fio de algodão e este posicionado na margem gengival. A ligadura

permaneceu até o fim do período experimental, totalizando oito semanas (Figura 6). O primeiro molar inferior direito do mesmo animal foi utilizado como controle (ausência de indução de periodontite por meio de ligadura de algodão).

A técnica escolhida, já foi apresentada em estudos anteriores no Departamento da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (Spalding, 2005; Souza, 2006; Amadei, 2007).



Figura 6 - Indução de doença periodontal por meio de ligadura.

4.2.5 Sacrifício dos animais

Transcorridas oito semanas, ou 56 dias, do início da administração das dietas, todos os animais foram sacrificados com dose excessiva de anestésico.

As hemi-mandíbulas foram removidas e o tecido mole excedente foi eliminado (Figura 7). A fixação foi realizada com solução de formaldeído a 10% tamponado, durante o período mínimo de 48 horas. As hemi-mandíbulas foram posteriormente descalcificadas para análise histológica e histomorfométrica.



Figura 7 – Hemi-mandíbula preparada para fixação.

A Figura 8 exemplifica o período experimental.

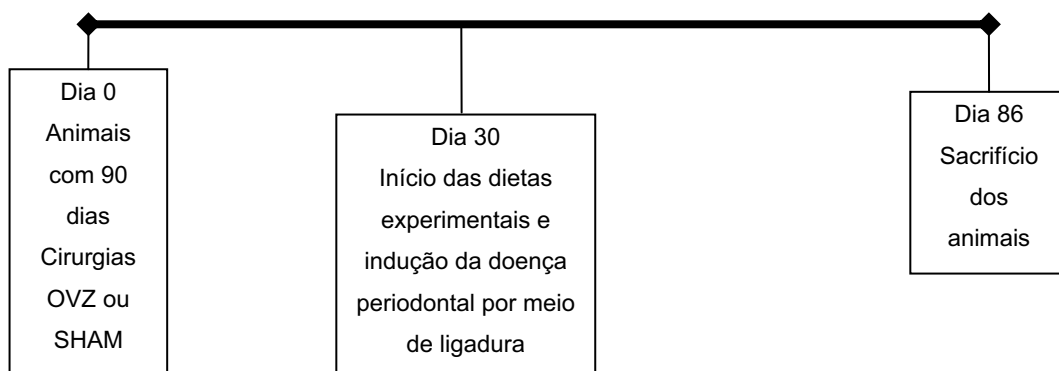


Figura 8 – Delineamento experimental.

4.3 Metodologia para análises

4.3.1 Alterações de peso corpóreo e condição nutricional

No início do experimento e imediatamente antes do sacrifício todos os animais foram pesados em balança semi-analítica (Micronal B600 – São Paulo, SP, Brasil) com a finalidade de verificar a interferência da dieta no desenvolvimento dos grupos experimentais. O percentual da variação de peso dos ratos foi calculado conforme a fórmula:

$$\text{Aumento de peso (\%)} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Quanto à condição nutricional, os valores médios diários da ração e dieta líquida consumida por gaiola foram registrados. A partir desses dados foram calculadas as médias de consumo por animal para os grupos experimentais, considerando ração ingerida (g) e solução líquida (mL) e estes transformados em quilocalorias. O consumo calórico (Kcal) foi calculado com base nas informações nutricionais dos fabricantes Nutrilabor (Guabi, Campinas-SP), P.A. (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro) e dados fornecidos pela literatura (Lieber, 2003; Rocha, 2005).

4.3.2 Alterações periodontais

4.3.2.1 Análise histológica e histomorfométrica

Depois de fixadas, as hemi-mandíbulas sofreram um processo de descalcificação em solução aquosa de ácido etilendinetriilo tetra-acético-sal dissódico dihidratado (EDTA – Titriplex P.A – Merck-KgaA, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 10%. A descalcificação foi determinada quando uma fina agulha conseguisse penetrar na dentina/esmalte sem resistência.

Em seguida, as peças foram preparadas para a inclusão em parafina (blocos contendo o primeiro molar inferior e estruturas adjacentes) com a face lingual paralela ao plano de corte. Foram realizados cortes seriados de 5µm no sentido mésio-distal, os quais foram obtidos a partir do momento que a raiz mesial do segundo molar inferior e distal do primeiro molar inferior permitissem a visualização, de maneira que a área interproximal pudesse ser analisada para as medidas correspondentes à perda óssea e inserção periodontal. As lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE).

Em cada subgrupo experimental foram selecionados cinco animais cujos cortes histológicos apresentassem adequada angulação e boa visualização das estruturas periodontais. Em seguida, as imagens de cada campo foram selecionadas em microscópio de luz Zeiss Axiophot 2 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com aumento necessário para cada análise. As imagens foram digitalizadas por câmera digital Axiocam MRm, com auxílio do programa Zeiss AxioVision FRET 4.7.2 (Copyright Carl Zeiss Imaging Solution GmbH, 2008), onde foi informado o aumento utilizado durante as fotografias.

4.3.2.1.1 Avaliação histomorfométrica do nível ósseo interproximal (NOi)

De acordo com Gaspersic et al. (2003) e Irie et al. (2008), para a avaliação do nível ósseo interproximal (NOi) é necessário medir a distância da JCE a COA. Para esta avaliação, foram selecionados cinco cortes interproximais com intervalos de 10 μ m, os quais foram fotografados com aumento ocular de 10X e objetiva de 10X. As mensurações foram realizadas por meio do programa Zeiss Axiovision FRET 4.7.2. Para a correta calibração do programa escolhido, uma lâmina contendo uma régua com 1000 μ m foi fotografada no mesmo aumento das imagens interproximais, sendo a escala criada com base na medida linear de 500 μ m. Todas as mensurações lineares da JCE a COA foram repetidas três vezes na face distal do primeiro molar e mesial do segundo molar inferior conferindo a média da imagem e posteriormente a média do animal (Figura 9).

As considerações para os valores do NOi obtidos foram realizadas considerando uma relação diretamente proporcional entre os valores do NOi e perda para a altura da crista óssea interproximal.

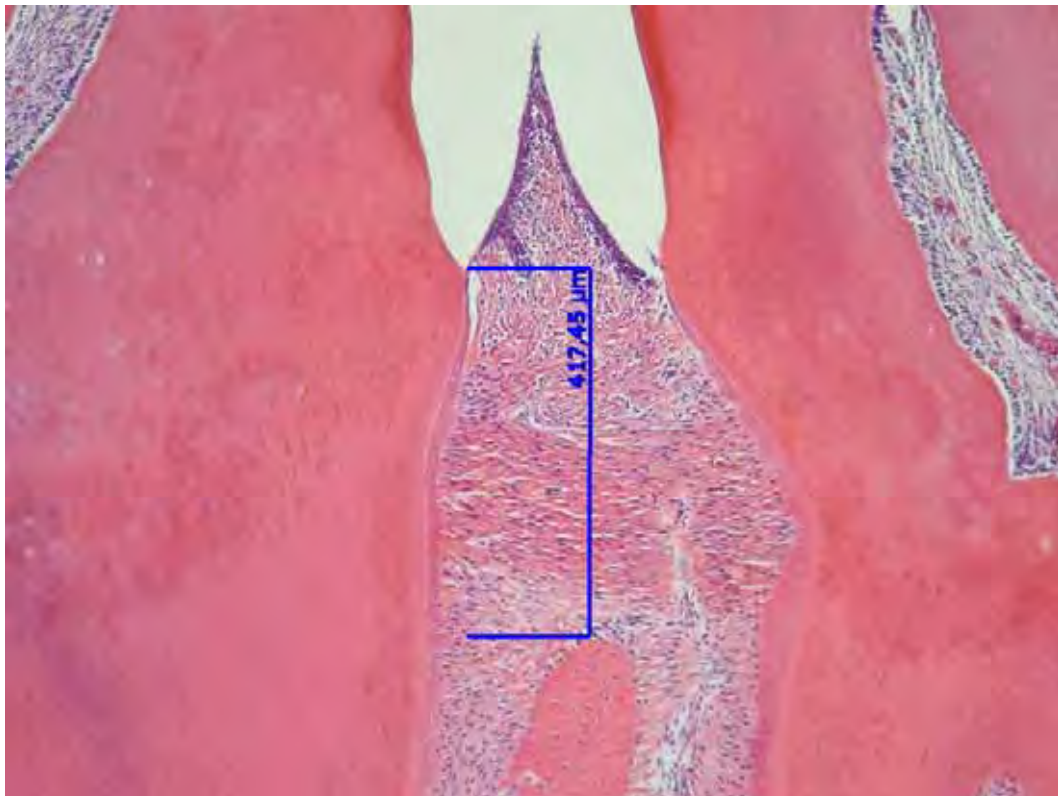


Figura 9 - Análise histomorfométrica do nível ósseo interproximal (HE, 100X).

4.3.2.1.2 Avaliação da inserção periodontal interproximal (IPi)

De acordo com o estudo de Gaspersic et al. (2003) e Irie et al. (2008), a inserção periodontal interproximal (IPi) foi avaliada pela medida linear da JCE a parte mais apical do epitélio juncional. Assim como na avaliação anterior, também foi proposta a repetição de três medidas na mesial e três medidas lineares na distal conferindo a média por imagem e posteriormente a média por animal (Figura 10).



Figura 10 - Análise histomorfométrica do nível de inserção periodontal interproximal (HE, 100X).

4.3.2.1.3 Avaliação histológica do processo inflamatório e reabsorção óssea interproximal

Os processos inflamatórios e resorptivos foram avaliados na região interproximal considerando aspectos próprios ao ligamento periodontal, crista óssea alveolar, tecido conjuntivo gengival e tecido epitelial. Foram avaliadas cinco secções por espécimes com intervalo de 10μm sendo utilizado microscópio de luz Zeiss Axiophot 2, com aumento ocular que variava entre 10X a 40X e objetiva de 10X.

Para tanto foi elaborado um quadro (Quadro 1) com os critérios a serem considerados sendo que para cada aspecto avaliado, foi considerada a normalidade de apresentação histológica. Os dados foram

estimados de forma percentual por animal e posteriormente o percentual do subgrupo experimental. Esta avaliação foi realizada por dois examinadores (duplo cego) e considerou o estudo de Galvão et al. (2003) e Liu et al. (2006) com algumas adaptações pertinentes a este estudo, sendo que:

a) O epitélio juncional foi considerado de dimensão padrão quando sua porção apical coincidia com a JCE e migrado quando estava apicalmente posicionado em relação à JCE (Figura 11); não proliferado quando se observava duas a três camadas dispostas organizadamente; com leve proliferação quando se observavam várias camadas dispostas organizadamente ou levemente desorganizadas ou ainda, proliferado intensamente quando observadas várias camadas dispostas aleatoriamente, muitas vezes enoveladas (Figura 12); com presença de degeneração hidrópica quando fossem observadas células com acúmulo de água no citoplasma e comprometimento do volume celular (Figura 13);

b) O tecido conjuntivo gengival foi avaliado em relação à quantificação de células fibroblásticas, as quais poderiam estar presentes de forma padrão ou abundante (Figura 14), com relação à inflamação onde foi considerado 1) Sem inflamação - ausência de células inflamatórias, 2) Inflamação leve - poucas células inflamatórias próximas ao epitélio juncional, 3) Inflamação moderada – presença e células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo, 4) Inflamação severa - mais que 1/3 das células do

tecido interproximal são células inflamatórias (Figura 15); as fibras colágenas do tecido gengival supracristal foram avaliadas quanto à hialinização, podendo esta se apresentar ausente ou presente (Figura 16); podendo ainda estas fibras se encontrar organizadas paralelamente ou desorientadas (Figura 17) ou inseridas ou não em cimento (Figura 18);

c) A crista óssea foi avaliada na sua porção mais coronária, sendo desconsiderados os itens presentes na tábua óssea na porção mediana e apical. Isto por que se considerou a movimentação fisiológica dos dentes presente em roedores e os processos resorptivos inerentes a esta movimentação. Quanto ao contorno da crista óssea este poderia estar regular ou irregular (Figura 19); com ausência, poucas ou muitas lacunas de reabsorção óssea, também chamadas de lacunas de Howship e com ou sem a presença de osteoclastos (Figura 20).

d) O ligamento periodontal foi avaliado em relação à quantificação de células fibroblásticas, as quais poderiam estar presentes de forma padrão ou abundante (Figura 21), e com relação à desorientação (Figura 22) e perda de inserção das fibras do ligamento periodontal no osso alveolar (Figura 23).

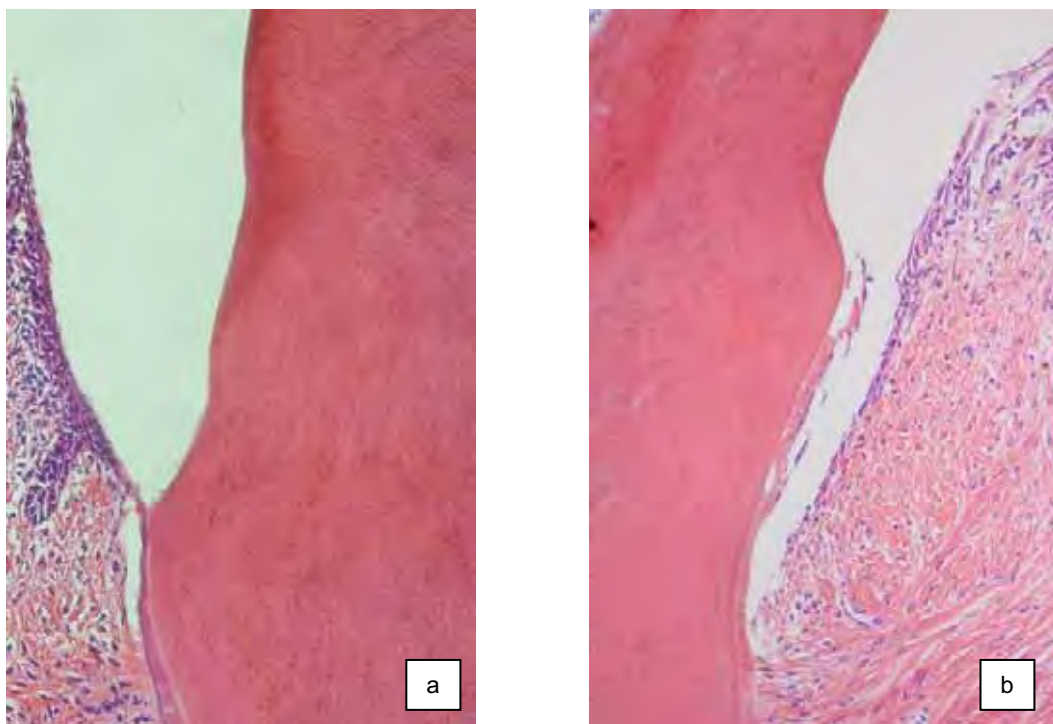


Figura 11 – Posicionamento do epitélio juncional em relação à JCE; a) dimensão padrão, b) migração apical (HE, 200X).

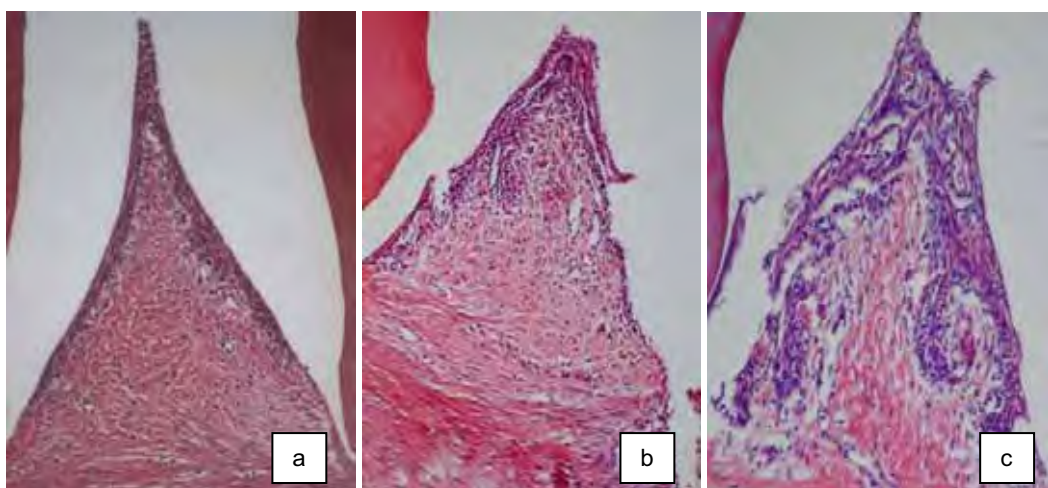


Figura 12 – Esquema representativo da proliferação epitelial; a) epitélio juncional não proliferado; b) epitélio juncional com leve proliferação; c) epitélio juncional proliferado intensamente (HE, 200X).

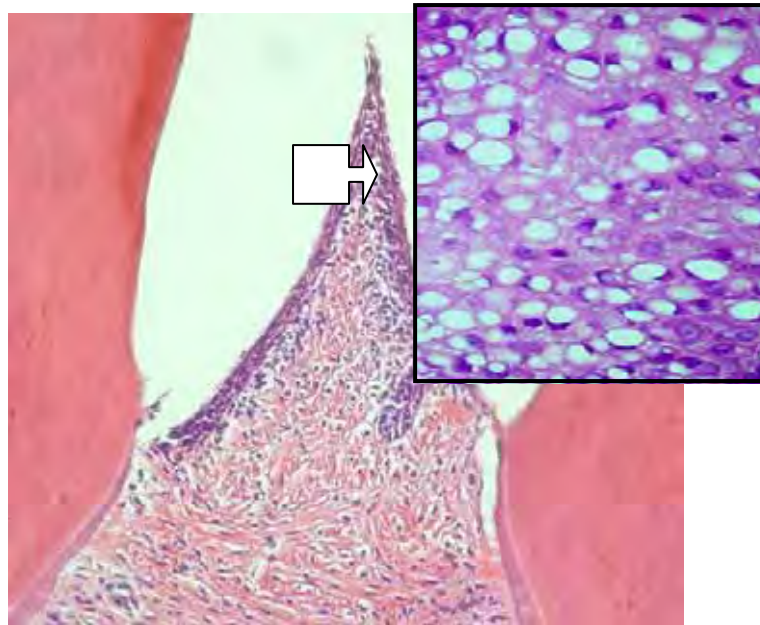


Figura 13 – Esquema representativo da degeneração hidrópica observada no epitélio juncional (HE, 200X; 400X).

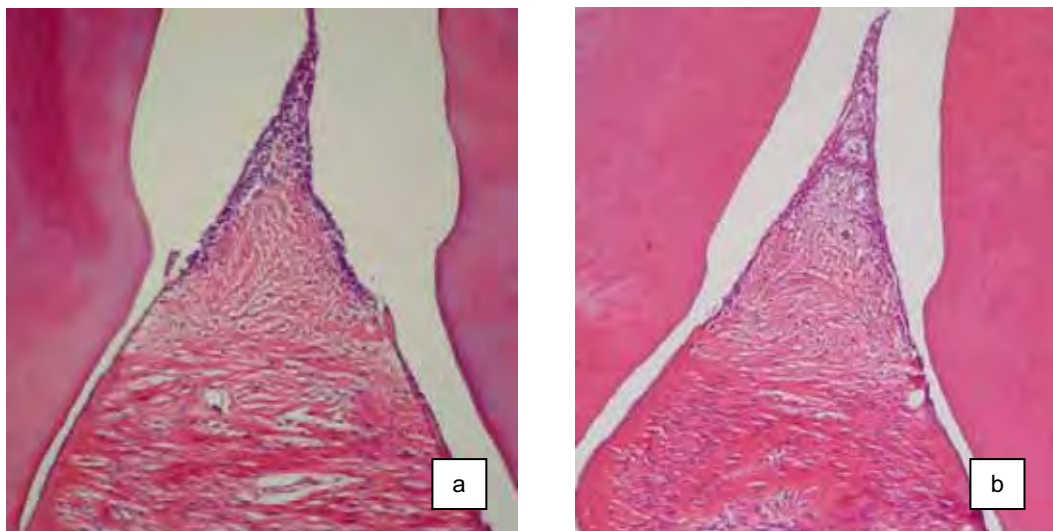


Figura 14 – Quantificação de células fibroblásticas do tecido conjuntivo gengival; a) quantidade padrão; b) presença abundante (HE, 200X).

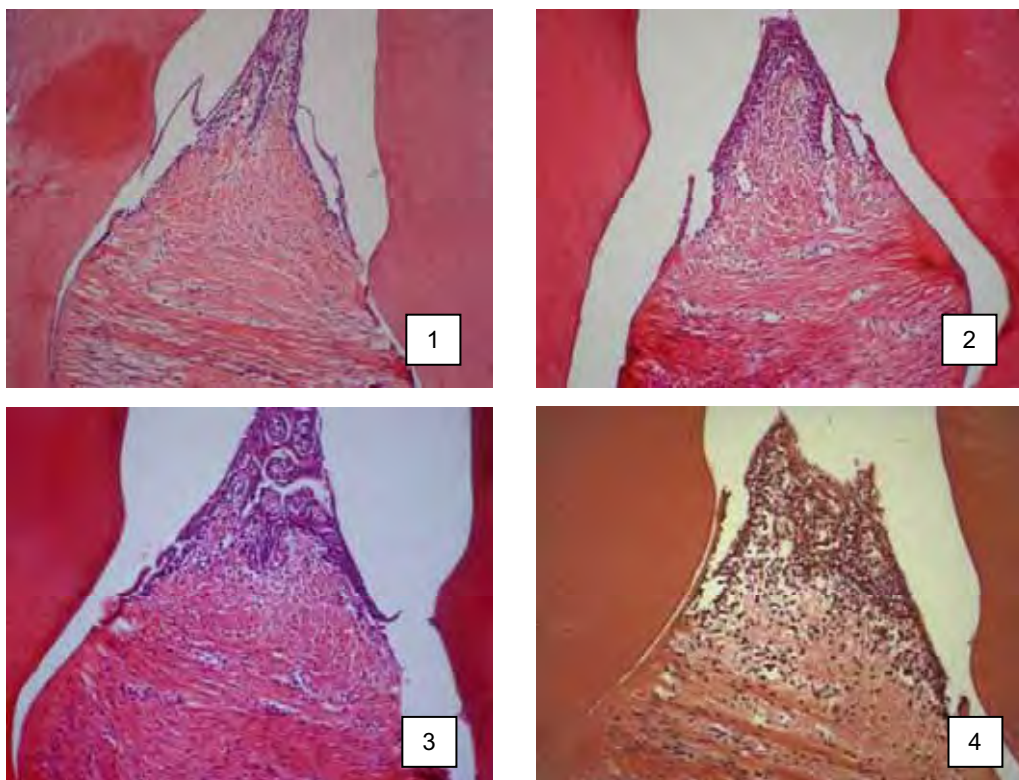


Figura 15 – Representação do índice inflamatório; 1) Sem inflamação; 2) Inflamação leve; 3) Inflamação moderada; 4) Inflamação severa (HE, 200X).

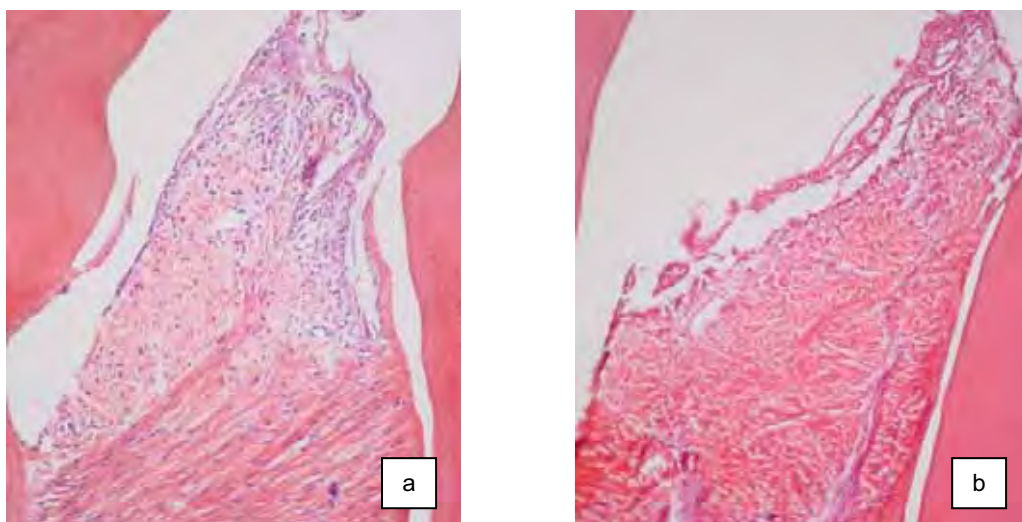


Figura 16 – Representação da hialinização das fibras colágenas gengivais; a) ausente; b) presente (HE, 200X).

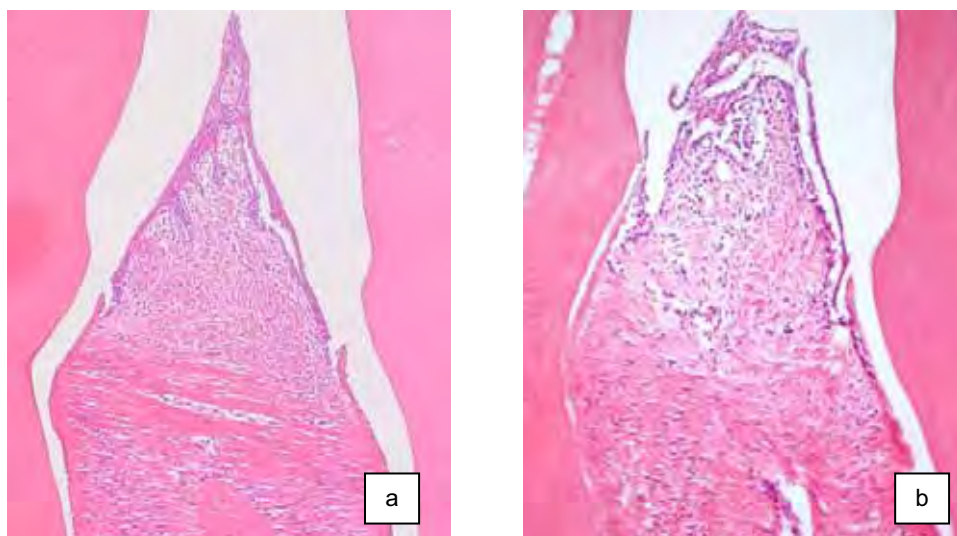


Figura 17 – Representação da orientação fibras colágenas gengivais; a) fibras organizadas paralelamente; b) fibras desorganizadas (HE, 200X).

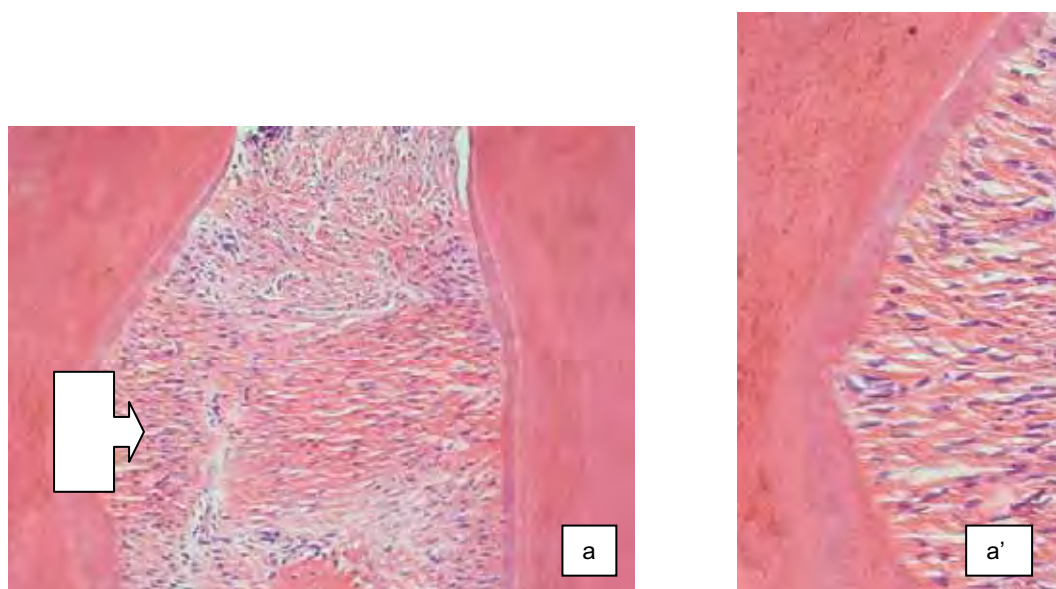


Figura 18 – Representação da inserção das fibras gengivais supracristais; a e a' representam fibras inseridas em cimento (HE, 200X; 400X).

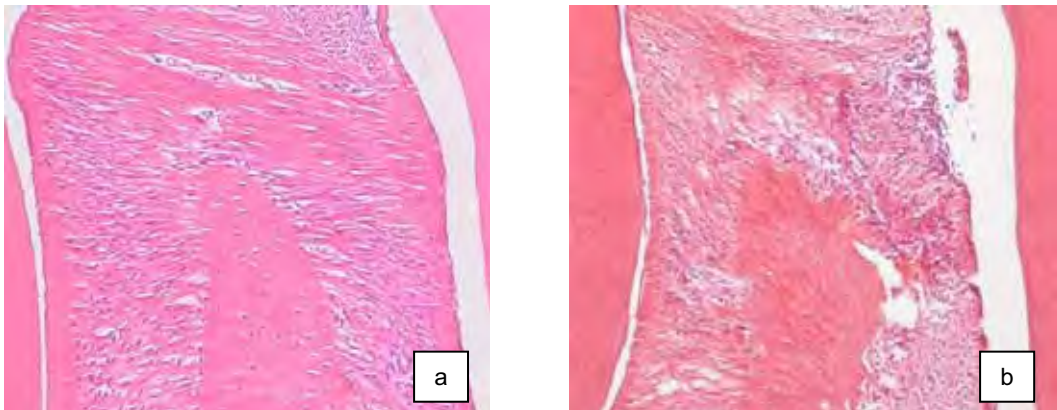


Figura 19 – Contorno da crista óssea interproximal; a) regular; b) irregular (HE, 200X).

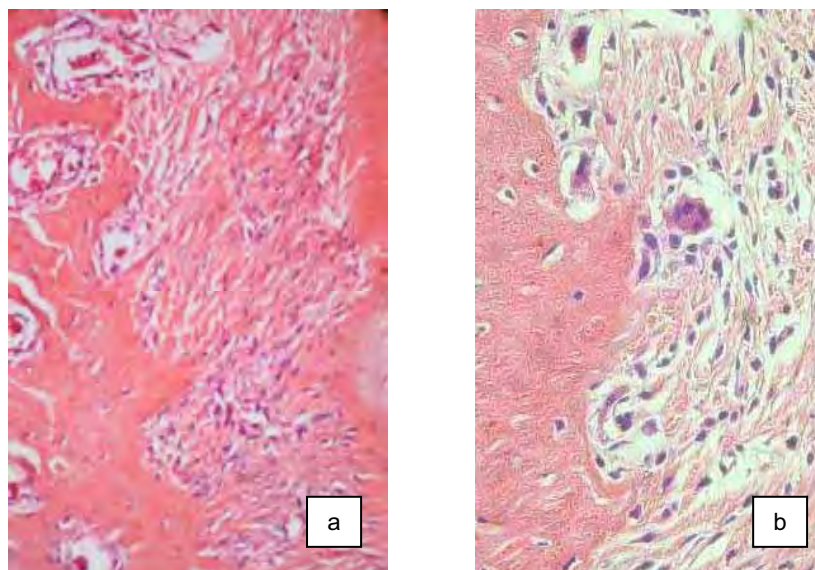


Figura 20 – Representação das lacunas de Howship; a) sem a presença de osteoclastos; b) com a presença de osteoclastos (HE, 400X).

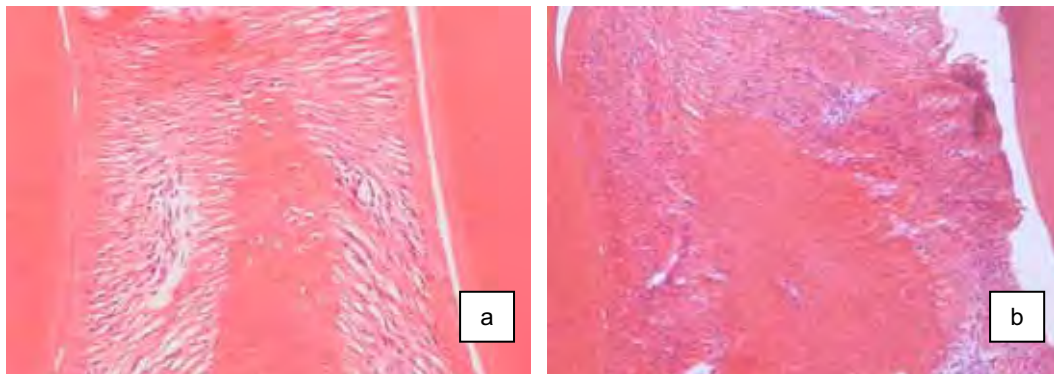


Figura 21 – Esquema representativo da quantificação fibroblástica do ligamento periodontal; a) quantidade padrão; b) presença abundante (HE, 200X).

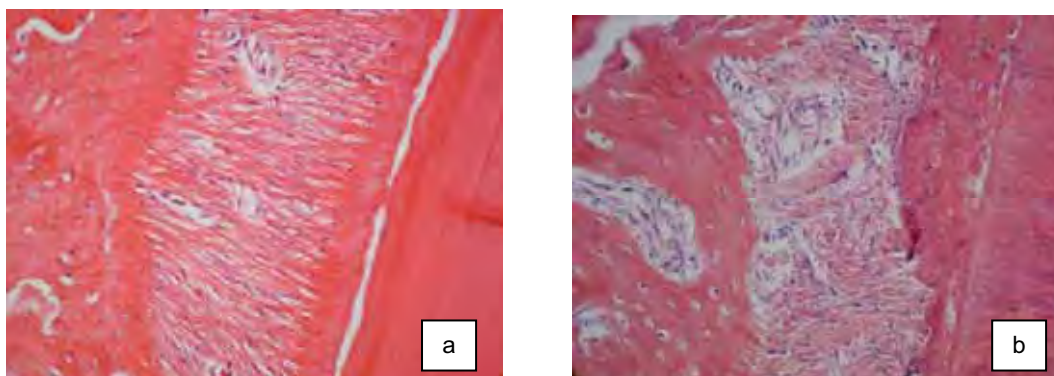


Figura 22 – Desorientação das fibras do ligamento periodontal; a) ausente; b) presente (HE, 400X).

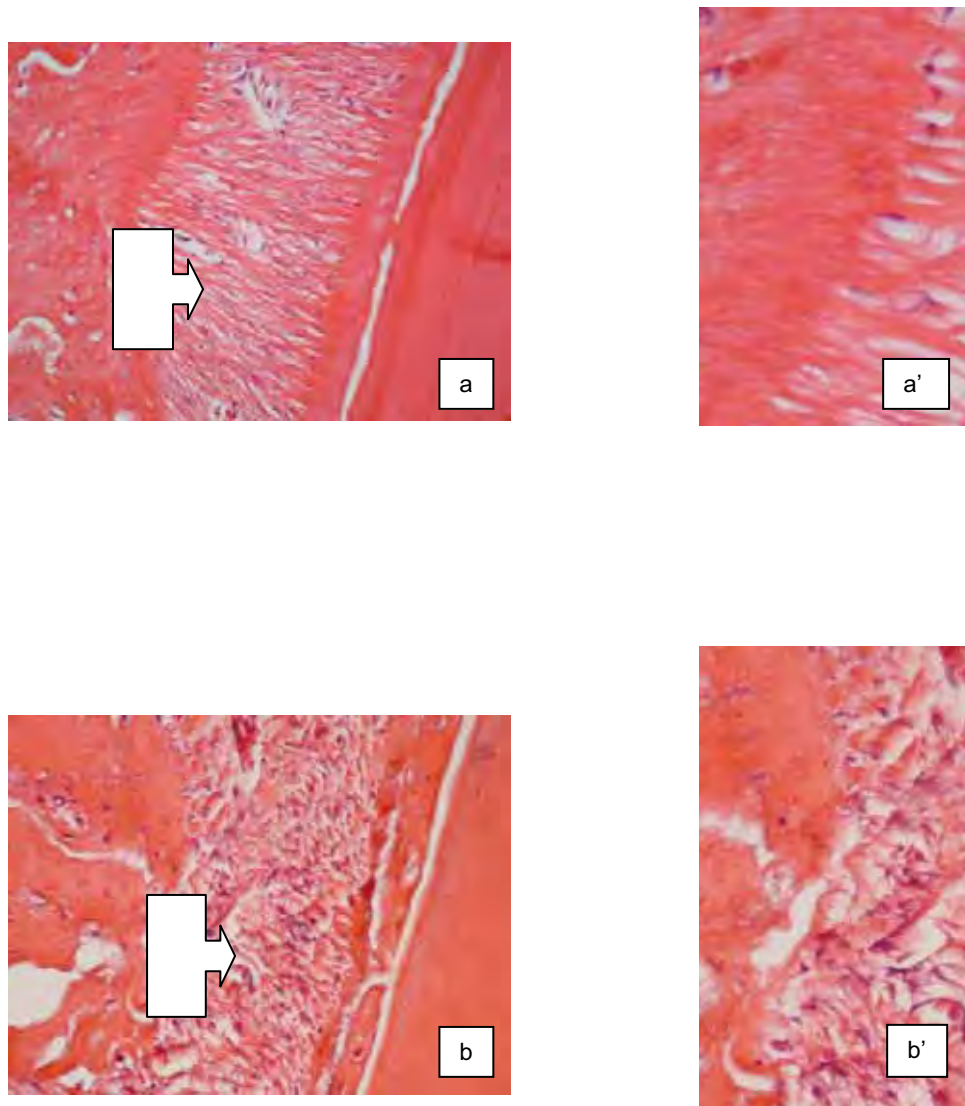


Figura 23 – Representação da inserção das fibras do ligamento periodontal; a e a' representam fibras inseridas, b e b' representam perda de inserção das fibras periodontais (HE, 400X).

Quadro 1 - Parâmetros considerados para as observações histológicas

Características histológicas		Considerações
EPITÉLIO	Posicionamento do epitélio juncional	padrão de normalidade apical à JCE
	Proliferação do epitélio juncional	ausente leve intensa
	Degeneração hidrópica	ausente presente
TECIDO CONJUNTIVO GENGIVAL	Quantificação de células fibroblásticas do tecido conjuntivo gengival	quantidade padrão abundante
	Presença de células inflamatórias interproximais	ausente próximas ao epitélio Juncional dispersas no tecido conjuntivo mais de 1/3 do tecido conjuntivo
	Hialinização do das fibras gengivais supracristais	ausente presente
	Desorientação das fibras gengivais supracristais	ausente presente
	Perda de inserção das fibras gengivais supracristais	ausente presente
OSSO ALVEOLAR	Contorno da crista óssea alveolar	regular irregular
	Lacunas de Howship	ausente poucas muitas
LIGAMENTO PERIODONTAL	Osteoclastos	ausente presente
	Células fibroblásticas do ligamento periodontal	quantidade padrão abundante
	Desorientação das fibras do ligamento periodontal	ausente presente
	Perda de inserção das fibras do ligamento periodontal	ausente presente

4.3.3 Análise estatística

Os valores obtidos para os pesos iniciais foram analisados pelos testes *ANOVA* e *Tukey* com significância de 5%.

A análise da alteração de peso ocorrida entre o início e o fim do experimento foi proposta de forma percentual visando adequar o modelo experimental. Para que os dados da alteração de peso ocorrida entre o início e o fim do experimento fossem validados estatisticamente, estes foram submetidos à transformação angular (arco seno da raiz quadrada da proporção mais uma constante de 0,5).

Com o propósito de verificar a confiabilidade e reprodutibilidade das mensurações lineares referentes à alteração da perda óssea e inserção periodontal, o examinador efetuou, para cada análise, duas mensurações em vinte espécimes, as quais foram realizadas com intervalo de uma semana. A análise estatística por meio de teste *t* pareado foi utilizada com a finalidade de comprovar a semelhança entre as médias. Também o teste estatístico de correlação de *Pearson* foi utilizado.

Com a finalidade de verificar uma possível interferência das dietas experimentais na alteração de peso, condição nutricional, medidas de perda óssea interproximal e inserção periodontal interproximal, os dados foram analisados conforme grupo SHAM e OVZ pelos testes *ANOVA* e *Tukey* com significância de 5%. A possível interferência da deficiência hormonal resultante do processo de castração foi avaliada pelo teste *t* independente.

Para cada análise, as características histológicas consideradas representativas para o perfil do grupo foram dicotomizadas em dois subgrupos sendo ausência ou leve inflamação periodontal e moderada ou intensa inflamação periodontal. Os dados obtidos foram

analisados por meio do teste de análise de correspondência assimétrica para os sítios sem e com doença periodontal induzida por ligadura.

Os seguintes programas foram utilizados: Minitab *for Windows*, versão 14.1 (Minitab Inc., State College, PA, USA); Statistix *for Windows*, versão 8,0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Alteração do peso corpóreo e condição nutricional

A distribuição dos animais para os grupos experimentais foi feita aleatoriamente. Considerando os testes *ANOVA* e *Tukey* (5%) para os grupos SHAM e OVZ, estes se mostraram homogêneos quanto ao peso inicial dos animais, sendo observado em média para SHAM 304,0g ($\pm 35,10$) e OVZ 300,67g ($\pm 34,46$). Quando os animais foram distribuídos entre os subgrupos SHAM (C, A, I) e OVZ (C, A, I) foi observado maior peso no grupo SHAM para o subgrupo A em relação aos subgrupos C e I, sendo a diferença estatística significativa ($p=0,0058$). No grupo OVZ, foi observado menor peso para o subgrupo C em relação aos subgrupos A e I, sendo a diferença estatística significativa ($p=0,00001$). Quando os subgrupos para dieta foram avaliados de forma não pareada pelo teste *t*, apenas o subgrupo SHAM-I e OVZ-I diferiram significativamente ($p=0,002$). As médias e desvio-padrão estão apresentados na Tabela 1 e Figura 24.

Tabela 1- Médias e desvio-padrão do peso corpóreo inicial nos grupos experimentais

	SHAM (g)	OVZ (g)
C	286 \pm 36,88 ^A	259,5 \pm 16,24 ^a
A	331 \pm 31,78 ^B	315,5 \pm 16,24 ^b
I	295 \pm 18,41 ^{A*}	327 \pm 20,03 ^{b*}

Médias seguidas por letras maiúsculas foram consideradas para coluna SHAM. Médias seguidas por letras minúsculas foram consideradas para coluna OVZ. Letras distintas diferem estatisticamente entre si (*ANOVA* e *post hoc Tukey*, $p<0,05$). Médias consideradas por linha entre SHAM e OVZ seguidas pelo símbolo (\star) diferem estatisticamente entre si (Teste *t* independente).

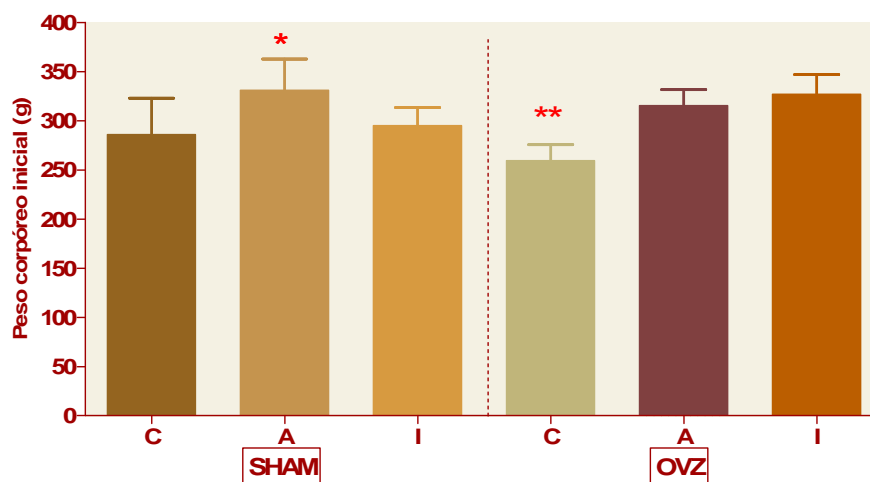


Figura 24 – Peso corpóreo inicial dos animais experimentais. Colunas seguidas por * foram consideradas significativas para SHAM. Colunas seguidas por ** foram consideradas significativas para OVZ (ANOVA e *post hoc Tukey*, $p < 0,05$).

Em relação aos valores obtidos para o percentual da alteração de peso, foi observado que a dieta influenciou significativamente os resultados, com ganho de peso no grupo SHAM para o subgrupo C em relação aos subgrupos A e I e maior perda de peso para o subgrupo I em relação ao subgrupo A ($p=0,00001$). Para o grupo OVZ foi observado ganho de peso significativo para o subgrupo C em relação aos subgrupos A e I ($p=0,00001$). Quando os subgrupos foram avaliados, a castração contribuiu significativamente com o ganho de peso observado para o subgrupo OVZ-C em relação aos animais SHAM-C ($p=0,0001$) e para a perda de peso observada para o grupo OVZ-A em relação a SHAM-A ($p=0,0001$). Os dados estão apresentados pela Tabela 2 e Figura 25.

Tabela 2 - Médias e desvio padrão da alteração do peso corpóreo percentual nos grupos experimentais

	SHAM (%)	OVZ (%)
C	15,50 ± 9,52 ^{A*}	31,29 ± 6,70 ^{a*}
A	-0,41 ± 7,28 ^{B*}	-2,63 ± 3,46 ^{b*}
I	-3,47 ± 7,60 ^C	-6,64 ± 9,37 ^b

Médias seguidas por letras maiúsculas foram consideradas para coluna SHAM. Médias seguidas por letras minúsculas foram consideradas para coluna OVZ. Letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e *post hoc Tukey*, $p < 0,05$). Médias consideradas por linha entre SHAM e OVZ seguidas pelo símbolo (★) diferem estatisticamente entre si (Teste t independente).

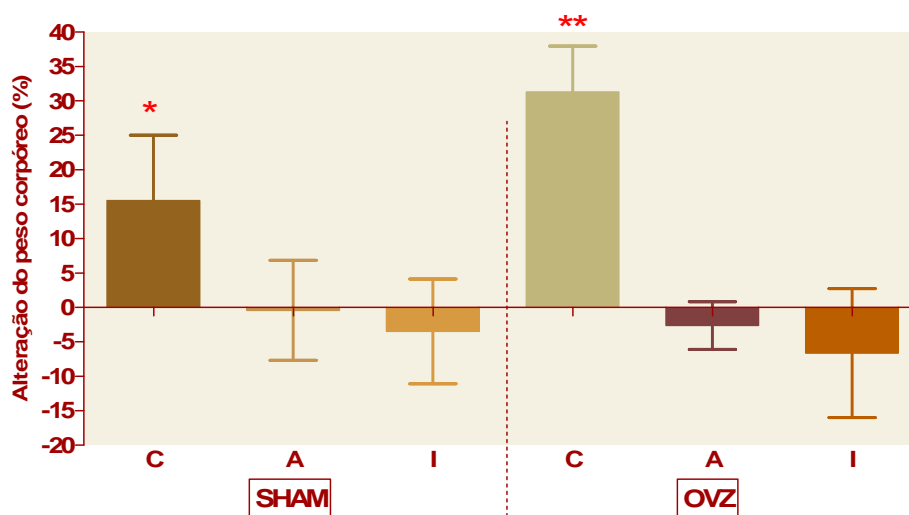


Figura 25 - Alteração de peso corpóreo dos animais experimentais. Colunas seguidas por * foram consideradas significativas para SHAM. Colunas seguidas por ** foram consideradas significativas para OVZ (ANOVA e *post hoc Tukey*, $p < 0,05$).

Com o propósito de avaliar se os grupos A e I seguiram a proposta da dieta isocalórica, os valores médios do consumo de ração e das soluções de etanol e solução de sacarose isocalórica ao etanol 20%

foram registrados diariamente durante as oito semanas do experimento e posteriormente convertidos em quilocalorias (Kcal).

Para as Kcal oriundas do consumo de ração, foi observado que a dieta influenciou significativamente os resultados, com maior consumo calórico nos grupos SHAM e OVZ para os subgrupos C em relação aos subgrupos A e I ($p=0,00001$) e ausência de diferença significativa entre os subgrupos A e I. Quando os subgrupos foram avaliados, a castração foi significativa para os subgrupos SHAM-C e OVZ-C ($p=0,0001$) e entre SHAM-I e OVZ-I ($p=0,0001$). Os valores das médias e desvio-padrão para os diferentes subgrupos experimentais estão representados na Tabela 3 e figura 26.

Tabela 3 - Médias e desvio-padrão das Kcal resultantes do consumo de ração nos grupos experimentais

	SHAM (Kcal)	OVZ (Kcal)
C	66,36 ± 0,87 ^{A★}	49,61 ± 2,08 ^{a★}
A	33,13 ± 4,07 ^B	32,00 ± 1,36 ^b
I	33,79 ± 0,30 ^{B★}	31,39 ± 0,18 ^{b★}

Médias seguidas por letras maiúsculas foram consideradas para coluna SHAM. Médias seguidas por letras minúsculas foram consideradas para coluna OVZ. Letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e *post hoc* Tukey, $p<0,05$). Médias consideradas por linha entre SHAM e OVZ seguidas pelo símbolo (★) diferem estatisticamente entre si (Teste t independente).

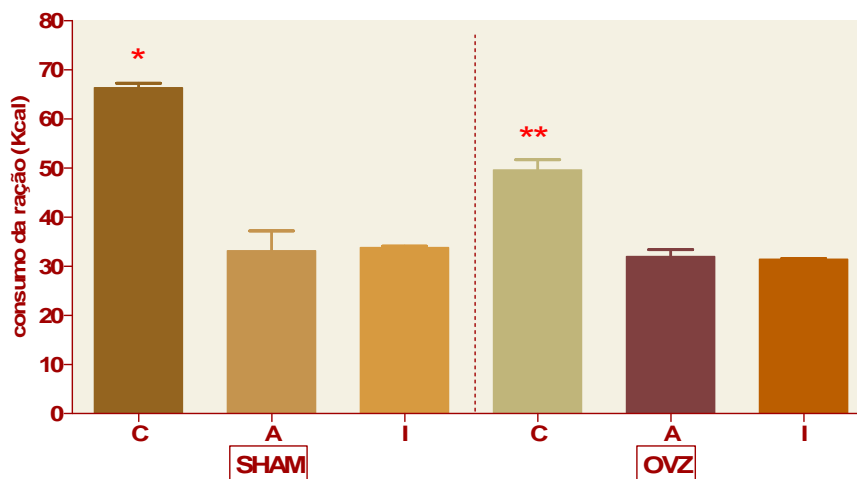


Figura 26 – Consumo calórico em função da dieta sólida para os grupos experimentais. Colunas seguidas por * foram consideradas significativas para SHAM. Colunas seguidas por ** foram consideradas significativas para OVZ (ANOVA e *post hoc* Tukey, $p < 0,05$).

Em relação as Kcal oriundas da dieta líquida, as análises estatísticas não denotaram diferenças para SHAM (A e I) e OVZ (A e I), mas foram observadas diferenças significativas entre SHAM-A, OVZ-A ($p=0,001$) e entre SHAM-I, OVZ-I ($p=0,001$), demonstrando que a castração influenciou o consumo dos animais. Visto que o grupo controle consumiu água (caloria zero), este grupo não participou dos testes estatísticos. Os valores médios e o desvio-padrão para os diferentes subgrupos experimentais estão representados na Tabela 4 e Figura 27.

Tabela 4 - Médias e desvio padrão das Kcal resultantes do consumo líquido nos grupos experimentais

	SHAM (Kcal)	OVZ (Kcal)
A	20,77 ± 0,489 ^{A★}	18,88 ± 0,924 ^{a★}
I	20,39 ± 0,425 ^{A★}	19,45 ± 0,639 ^{a★}

Médias seguidas por letras maiúsculas foram consideradas para coluna SHAM. Médias seguidas por letras minúsculas foram consideradas para coluna OVZ. Letras distintas diferem estatisticamente entre si. Médias consideradas por linha entre SHAM e OVZ seguidas pelo símbolo (★) diferem estatisticamente entre si (Teste t independente).

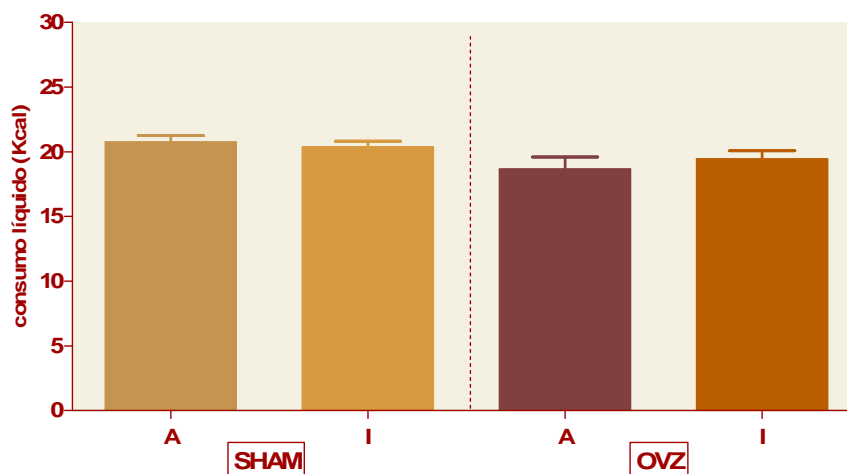


Figura 27 – Consumo calórico em função da dieta líquida para os grupos experimentais. Colunas seguidas por * foram consideradas significativas para SHAM. Colunas seguidas por ** foram consideradas significativas para OVZ (ANOVA e *post hoc* Tukey, $p < 0,05$).

O percentual de consumo calórico que a ração e a dieta líquida representaram no consumo calórico total por grupo está apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Médias e desvio-padrão do percentual de Kcal representado pelo consumo da ração e dieta líquida nos grupos experimentais

	SHAM (% Kcal)			OVZ (% Kcal)		
	Ração	Líquido	Total	Ração	Líquido	Total
C	100	0	100	100	0	100
A	61,25 ± 3,37	38,75 ± 3,37	100	62,90 ± 0,78	37,09 ± 0,77	100
I	62,36 ± 0,58	37,63 ± 0,57	100	61,39 ± 1,07	38,60 ± 1,07	100

5.2 Avaliações periodontais

A análise estatística por meio de teste t pareado foi utilizada com a finalidade de verificar a confiabilidade e reprodutibilidade das mensurações lineares. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as duas mensurações realizadas com intervalo de uma semana tanto para avaliação da perda óssea quanto do nível de inserção periodontal ($p>0,05$). Os coeficientes de correlação (r) encontrados foram 0,9953 e 0,9235 respectivamente e indicaram alta confiabilidade.

5.2.1 Avaliação histomorfométrica do nível ósseo interproximal

5.2.1.1 Ausência de doença periodontal

Na ausência da doença periodontal induzida, foi observada, para os grupos SHAM e OVZ, perda óssea significativa para o subgrupo A em relação aos subgrupos I e C (respectivamente SHAM, $p=0,0005$; OVZ, $p=0,0002$) sugerindo influencia da dieta alcoólica para ratas com e sem deficiência estrogênica. Quando os subgrupos foram avaliados, foi observada perda óssea significativa quando o subgrupos A e I estavam associados à ovariectomia, sendo SHAM-A, OVZ-A ($p=0,001$) e SHAM-I, OVZ-I ($p=0,037$), sugerindo que a castração interferiu para os grupos com deficiência nutricional induzido uma maior perda óssea.

As médias e desvio padrão para os seis tratamentos foram apresentadas na Tabela 6 e Figura 28.

Tabela 6- Médias e desvio padrão do NOi nos grupos experimentais sem doença periodontal induzida

	SHAM (μm)	OVZ (μm)
C	266,90 \pm 32,31 ^A	324,49 \pm 48,83 ^a
A	390,24 \pm 34,28 ^{B*}	515,65 \pm 37,45 ^{b*}
I	302,52 \pm 41,41 ^{A*}	391,47 \pm 62,20 ^{a*}

Médias seguidas por letras maiúsculas foram consideradas para coluna SHAM. Médias seguidas por letras minúsculas foram consideradas para coluna OVZ. Letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e *post hoc Tukey*, $p < 0,05$). Médias consideradas por linha entre SHAM e OVZ seguidas pelo símbolo (*) diferem estatisticamente entre si (Teste t independente).

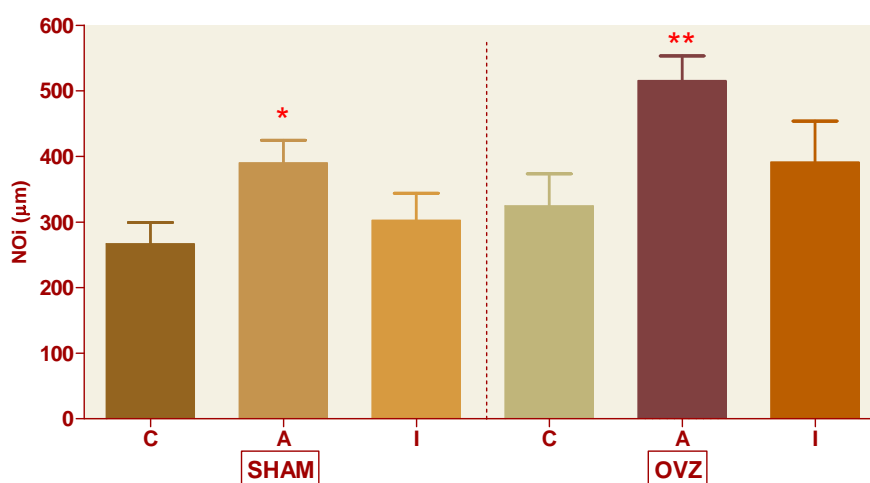


Figura 28 – Nível ósseo interproximal (NOi) dos grupos experimentais sem doença periodontal induzida. Colunas seguidas por * foram consideradas significativas para SHAM. Colunas seguidas por ** foram consideradas significativas para OVZ (ANOVA e *post hoc Tukey*, $p < 0,05$).

5.2.1.2 Presença da doença periodontal

Quando a doença periodontal foi induzida por meio da ligadura foi observada, para os grupos SHAM e OVZ, menor perda óssea para o subgrupo C em relação aos subgrupos A e I, sendo esta diferença

significativa (respectivamente SHAM, $p=0,0105$; OVZ, $p=0,0161$) sugerindo que deficiência nutricional agravou a perda óssea para ratas sem e com deficiência estrogênica. Quando os subgrupos foram avaliados, o nível ósseo não se mostrou significativamente associado à ovariectomia, sendo que não foram notadas diferenças estatísticas entre os subgrupos C (SHAM-OVZ), A (SHAM-OVZ) e I (SHAM-OVZ).

As médias e desvio-padrão para os seis tratamentos foram apresentadas na Tabela 7 e Figura 29.

Tabela 7 - Médias e desvio padrão do NOi nos grupos experimentais com doença periodontal induzida

	SHAM (μm)	OVZ (μm)
C	625,0 \pm 100,72 ^A	644,6 \pm 96,16 ^a
A	812,9 \pm 89,75 ^B	824,6 \pm 66,53 ^b
I	798,2 \pm 76,45 ^B	795,3 \pm 99,33 ^b

Médias seguidas por letras maiúsculas foram consideradas para coluna SHAM. Médias seguidas por letras minúsculas foram consideradas para coluna OVZ. Letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e *post hoc* Tukey, $p<0,05$). Médias consideradas por linha entre SHAM e OVZ seguidas pelo símbolo (★) diferem estatisticamente entre si (Teste t independente).

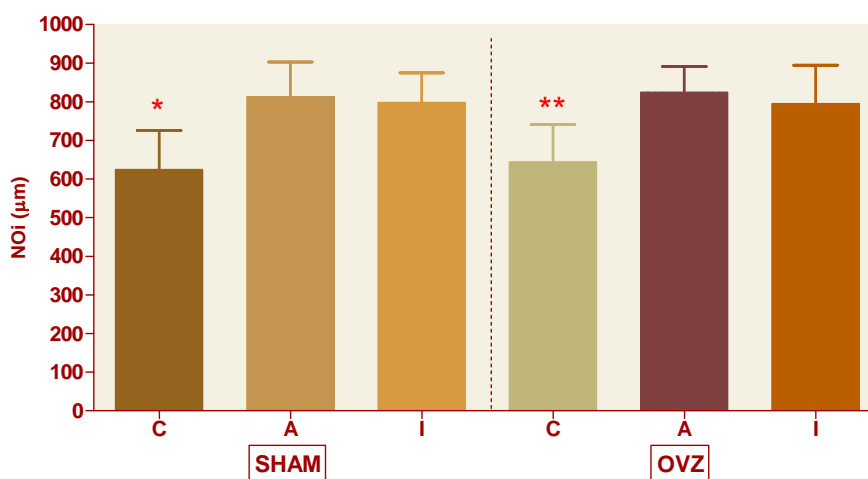


Figura 29 – Nível ósseo interproximal (NOi) dos animais experimentais com doença periodontal induzida. Colunas seguidas por * foram consideradas significativas para SHAM. Colunas seguidas por ** foram consideradas significativas para OVZ (ANOVA e *post hoc* Tukey, $p<0,05$).

5.2.2 Avaliação da inserção periodontal interproximal

5.2.2.1 Ausência de doença periodontal

Para o grupo SHAM, sem indução doença periodontal foi observado menor valor de IPI para o subgrupo C em relação ao subgrupo A e subgrupo I, sendo a diferença significativa ($p=0,0039$). No grupo OVZ não foram observadas diferenças estatísticas entre os subgrupos. Os dados sugeriram que a deficiência nutricional foi capaz de induzir perda de inserção para animais SHAM. Quando os subgrupos foram analisados observou-se que os grupos SHAM-C e OVZ-C diferiram significativamente ($p=0,004$) com uma maior perda de inserção para animais OVZ-C.

As médias e desvio-padrão para os seis tratamentos podem ser observadas na Tabela 8 e Figura 30.

Tabela 8- Médias e desvio padrão do IPI nos grupos experimentais sem doença periodontal induzida.

	SHAM (μm)	OVZ (μm)
C	34,91 \pm 9,69 ^{A★}	76,70 \pm 18,66 ^{a★}
A	91,20 \pm 23,72 ^B	103,62 \pm 21,82 ^a
I	100,91 \pm 37,76 ^B	71,08 \pm 46,90 ^a

Médias seguidas por letras maiúsculas foram consideradas para coluna SHAM. Médias seguidas por letras minúsculas foram consideradas para coluna OVZ. Letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e *post hoc Tukey*, $p<0,05$). Médias consideradas por linha entre SHAM e OVZ seguidas pelo símbolo (★) diferem estatisticamente entre si (Teste t independente).

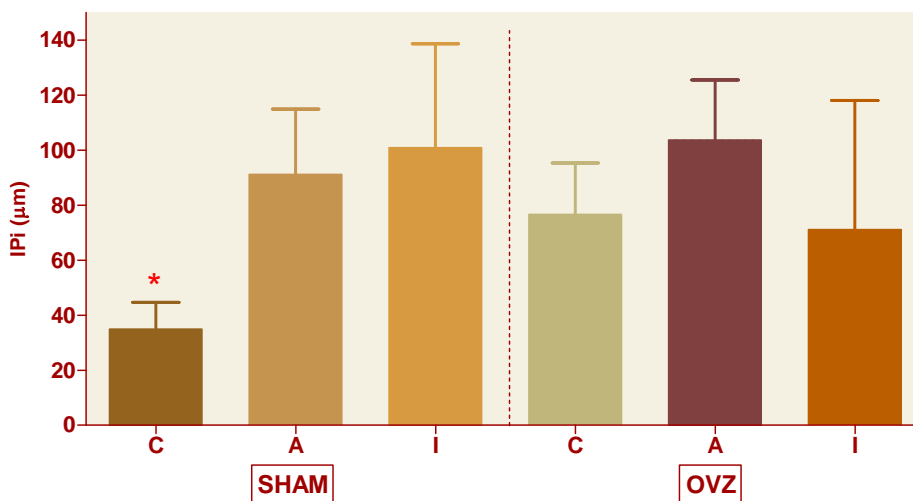


Figura 30 – Inserção periodontal interproximal (IPI) dos animais experimentais sem doença periodontal induzida. Colunas seguidas por * foram consideradas significativas para SHAM. Colunas seguidas por ** foram consideradas significativas para OVZ (ANOVA e *post hoc Tukey*, $p < 0,05$).

5.2.1.2 Presença da doença periodontal

Quando a doença periodontal foi induzida por meio da ligadura não foram observadas diferenças significativas para IPI, para os grupos SHAM e OVZ nos subgrupos C, A e I, sugerindo não haver interferência da dieta na perda de inserção periodontal. Quando a inserção periodontal foi avaliada nos subgrupos em função da castração não foram verificadas diferenças entre SHAM e OVZ. As médias e desvios padrão foram apresentados na Tabela 9 e Figura 31.

Tabela 9 - Médias e desvio padrão do IPI nos grupos experimentais com doença periodontal induzida

	SHAM (μm)	OVZ (μm)
C	391,8 \pm 58,77 ^A	459,3 \pm 75,67 ^a
A	522,2 \pm 102,99 ^A	527,6 \pm 81,55 ^a
I	474,6 \pm 87,81 ^A	555,4 \pm 92,47 ^a

Médias seguidas por letras maiúsculas foram consideradas para coluna SHAM. Médias seguidas por letras minúsculas foram consideradas para coluna OVZ. Letras distintas diferem estatisticamente entre si (ANOVA e *post hoc* Tukey, $p < 0,05$). Médias consideradas por linha entre SHAM e OVZ seguidas pelo símbolo (*) diferem estatisticamente entre si (Teste t independente).

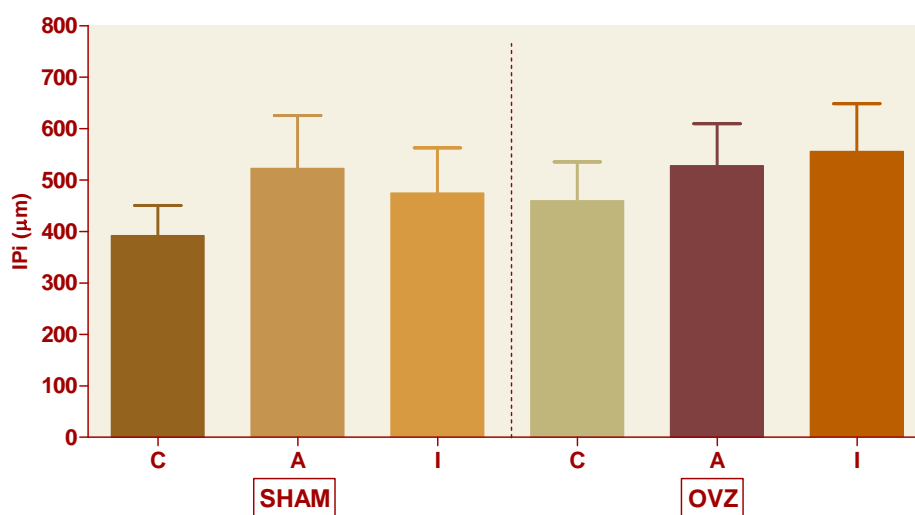


Figura 31 – Inserção periodontal interproximal (IPI) dos animais experimentais com doença periodontal induzida. Colunas seguidas por * foram consideradas significativas para SHAM. Colunas seguidas por ** foram consideradas significativas para OVZ (ANOVA e *post hoc* Tukey, $p < 0,05$).

5.2.3 Avaliação histológica do processo inflamatório e reabsorção óssea interproximal

Foram observados aspectos microscópicos bastantes distintos entre animais com e sem a indução da doença periodontal.

5.2.3.1 Ausência de doença periodontal

Os cortes histológicos dos espécimes sem indução da periodontite apresentaram epitélio juncional posicionado na JCE ou discretamente migrado em direção apical. A maioria dos espécimes mostrou ausência ou leve proliferação epitelial sendo algumas vezes também observada uma proliferação mais acentuada com perda de organização das camadas epiteliais, as quais se comportavam de forma enovelada com perda da adesão celular, constantemente havia presença de degeneração hidrópica.

De um modo geral, havia ausência da inflamação ou se observava presença de células inflamatórias mononucleadas, dispostas no tecido conjuntivo logo abaixo do epitélio juncional. O tecido conjuntivo frequentemente exibia um padrão de normalidade quanto à quantificação dos fibroblastos, os quais exibiam núcleos alongados e evidentes. Os feixes de fibras colágenas apresentavam um padrão de alinhamento paralelo formando grandes bandas na região supracristal, sendo raramente observada perda de orientação. Vasos sanguíneos por vezes congestos estavam presentes.

A crista óssea alveolar inter-radicular exibiu extremidade arredondada ou estava levemente irregular, sendo nestes casos visível lacunas de reabsorção óssea (lacunas de Howship) mesmo na porção

mais coronária. As regiões mais profundas da crista óssea apresentavam maiores irregularidades, sendo bastante evidente a remodelação óssea em virtude da movimentação dentária fisiológica observada dentro da normalidade em roedores. No ligamento periodontal foram observados canais vasculares, fibroblastos alongados e feixe de fibras colágenas bem direcionadas, cujas fibras de Sharpey estavam bem inseridas no osso alveolar inter-radicular e no cimento. Também foram observados espécimes com perda de orientação e perda de inserção do ligamento periodontal.

O tecido ósseo exibiu aspecto regular e denso, com muitos osteócitos distribuídos homogeneamente e poucos espaços medulares.

O comportamento histológico para os seis grupos analisados pode ser observado nas Figuras 32, 33, 34, 35, 36 e 37.

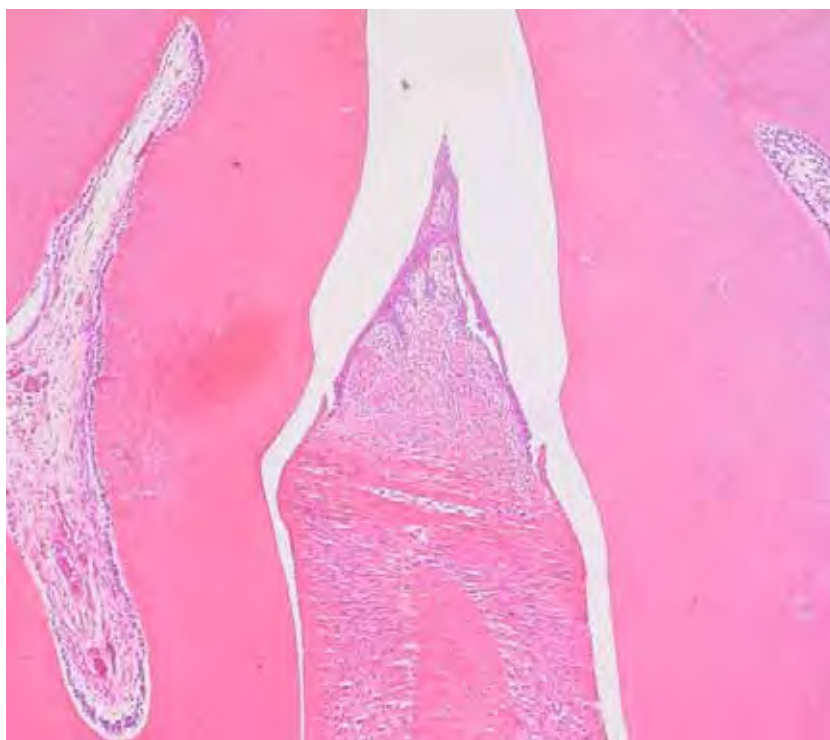


Figura 32 - Imagem representativa do grupo C-SHAM sem indução da doença periodontal (HE, 100x).

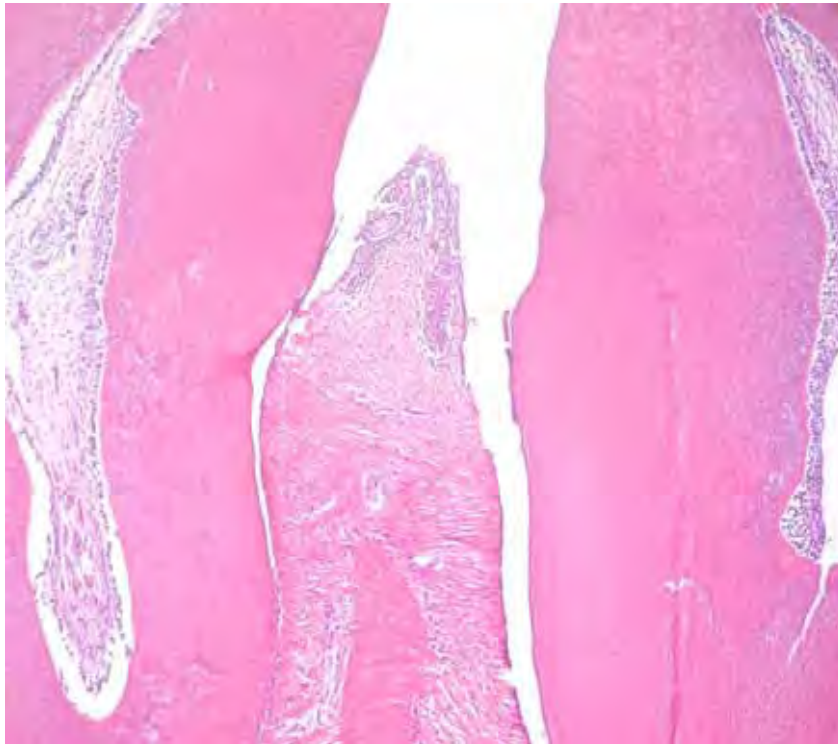


Figura 33 - Imagem representativa do grupo C-OVZ sem indução da doença periodontal (HE, 100x).

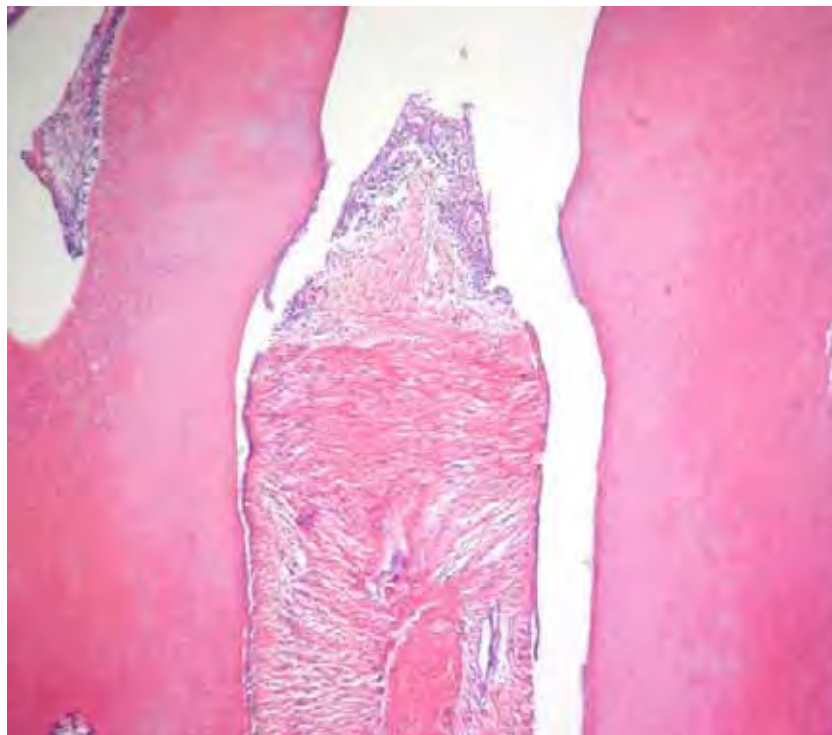


Figura 34 - Imagem representativa do grupo A-SHAM sem indução da doença periodontal (HE, 100x).

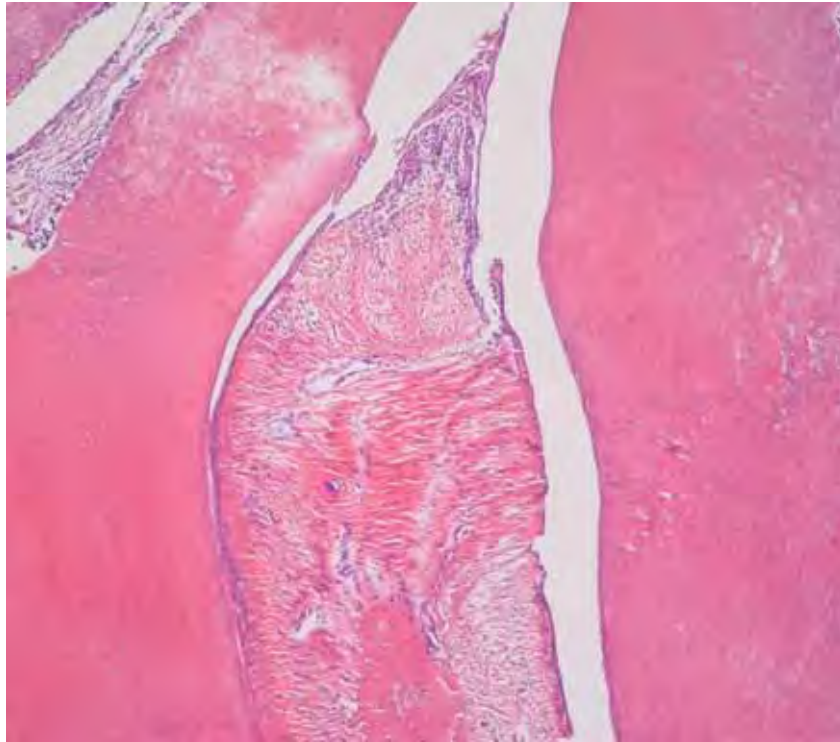


Figura 35 - Imagem representativa do grupo A-OVZ sem indução da doença periodontal (HE, 100x).

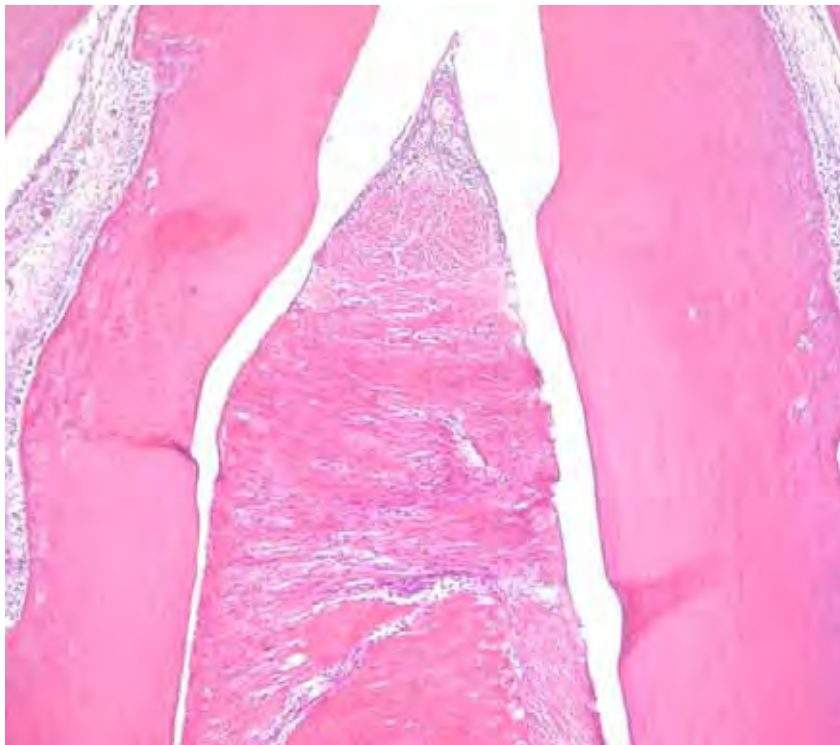


Figura 36 - Imagem representativa do grupo I-SHAM sem indução da doença periodontal (HE, 100x).

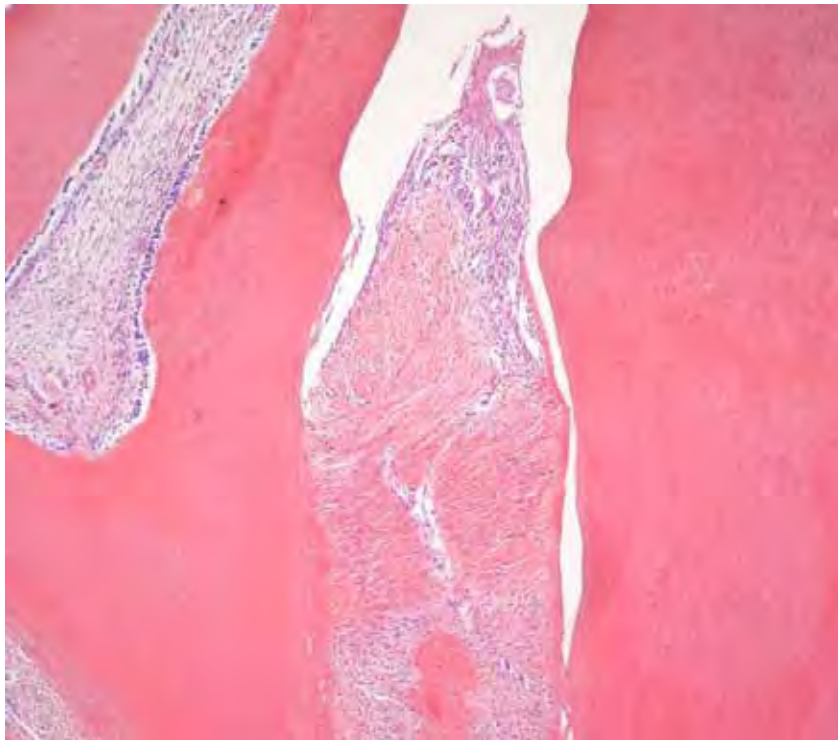


Figura 37 - Imagem representativa do grupo I-OVZ sem indução da doença periodontal (HE, 100x).

O comportamento histológico percentual para os seis subgrupos analisados foi apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 - Comportamento histológico periodontal interproximal dos animais sem indução da doença periodontal (*continua*)

ANIMAIS SEM INDUÇÃO DA DOENÇA PERIODONTAL - DADOS EM %							
Características histológicas		SHAM			OVZ		
		C	A	I	C	A	I
EPITÉLIO	posicionamento do epitélio juncional						
	padrão de normalidade	60	0	20	60	0	80
	apical à JCE	40	100	80	40	100	20
	proliferação do epitélio juncional						
	ausente	60	0	20	40	0	20
	leve	40	80	80	40	80	60
	intensa	0	20	0	20	20	20
	degeneração hidrópica						
	ausente	40	0	60	0	0	40
presente	60	100	40	100	100	60	
TECIDO CONJUNTIVO GENGIVAL	quantificação de células fibroblásticas do tecido conjuntivo gengival						
	quantidade padrão	80	80	80	100	80	100
	abundante	20	20	20	0	20	0
	presença de células Inflamatórias interproximais						
	ausente	60	80	0	40	0	20
	próximas ao epitélio juncional	40	20	80	60	60	80
	dispersas no tecido conjuntivo	0	0	20	0	40	0
	mais de 1/3 do tecido conjuntivo	0	0	0	0	0	0
	hialinização das fibras gengivais supracristais						
	ausente	100	100	100	100	100	100
	presente	0	0	0	0	0	0
	desorientação das fibras gengivais supracristais						
	ausente	100	80	100	100	80	60
	presente	0	20	0	0	20	40
	perda de inserção das fibras gengivais supracristais						
ausente	100	100	100	100	100	100	
presente	0	0	0	0	0	0	

Quadro 2 - Comportamento histológico periodontal interproximal dos animais sem indução da doença periodontal (*conclusão*)

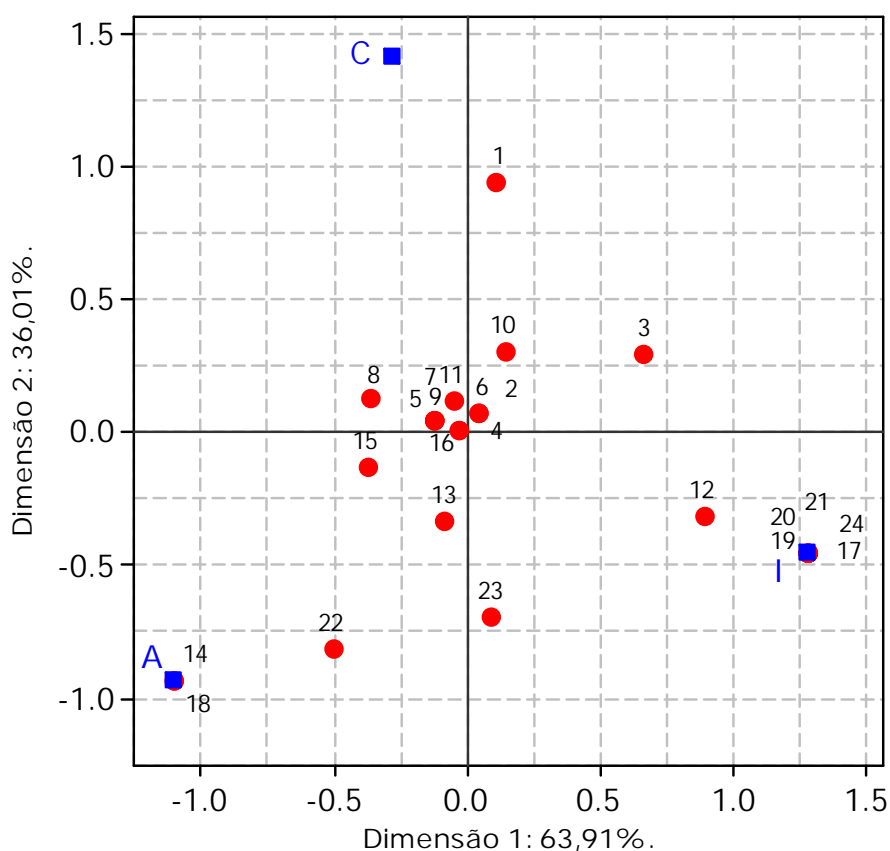
OSSO ALVEOLAR	contorno da crista óssea alveolar						
	regular	100	100	80	100	80	60
	irregular	0	0	20	0	20	40
	lacunas de Howship						
	ausente	100	100	40	80	80	60
	poucas	0	0	40	20	20	40
muitas	0	0	20	0	0	0	
LIGAMENTO PERIODONTAL	osteoclastos						
	ausente	100	100	80	80	40	40
	presente	0	0	20	20	60	60
	quantificação de células do ligamento periodontal						
	quantidade padrão	100	40	80	100	80	40
	abundante	0	60	20	0	20	60
	desorientação das fibras do ligamento periodontal						
	ausente	100	80	80	100	40	60
	presente	0	20	20	0	60	40
	perda de inserção das fibras do ligamento periodontal						
ausente	100	100	80	100	100	100	
presente	0	0	20	0	0	0	

Os dados considerados representativos para o perfil dos subgrupos SHAM (C, A e I) e OVZ (C, A e I) foram separados para considerações relacionadas com ausência ou leve inflamação periodontal e condições relacionadas com moderada ou intensa inflamação periodontal e a análise de correspondência foi aplicada com a finalidade de visualizar os resultados.

Para o grupo SHAM, sem indução da doença periodontal, foram consideradas 24 características histológicas que variavam entre os subgrupos. A Figura 38 representa o perfil da distribuição das características consideradas para os subgrupos SHAM. Nesta, observa-se a representação para três subgrupos distintos (C, A e I) e suas características histológicas, os quais foram indicados por pontos em um

espaço bidimensional. As magnitudes para as distâncias foram respectivamente distância 1: 63,91% e distância 2: 36,01% e representaram o percentual de projeção das características histológicas para o eixo 1 e 2. Considerando os dois eixos de análise o subgrupo I foi melhor representado no eixo 1 (correlação de 0,934), seguido pelo subgrupo A (correlação de 0,715) os quais apresentaram perfis bastante distintos. Já o subgrupo C foi melhor representado no eixo 2 (correlação de 0,935) se caracterizando como um grupo intermediário a I e A.

As características histológicas que respectivamente distinguiram o subgrupo A dos demais foram: 14 e 18 e 22 (visto a frequência de proliferação intensa do epitélio juncional, fibras colágenas do tecido gengival desorganizadas e quantidade abundante de células fibroblásticas do tecido gengival, sendo estas características compatíveis com inflamação moderada a intensa), para o subgrupo C foi a característica 1 (com um predomínio de espécimes sem migração apical do epitélio juncional em relação aos demais subgrupos) e para o subgrupo I foram as características: 17, 19, 20, 21, 24 e 12 (considerando a frequência de células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo, contorno da crista óssea irregular, presença de lacunas de Howship, osteoclastos e perda de inserção das fibras do ligamento periodontal, sendo compatíveis com inflamação moderada a intensa). As demais características apresentaram baixa inércia, portanto baixa variabilidade entre os subgrupos analisados.

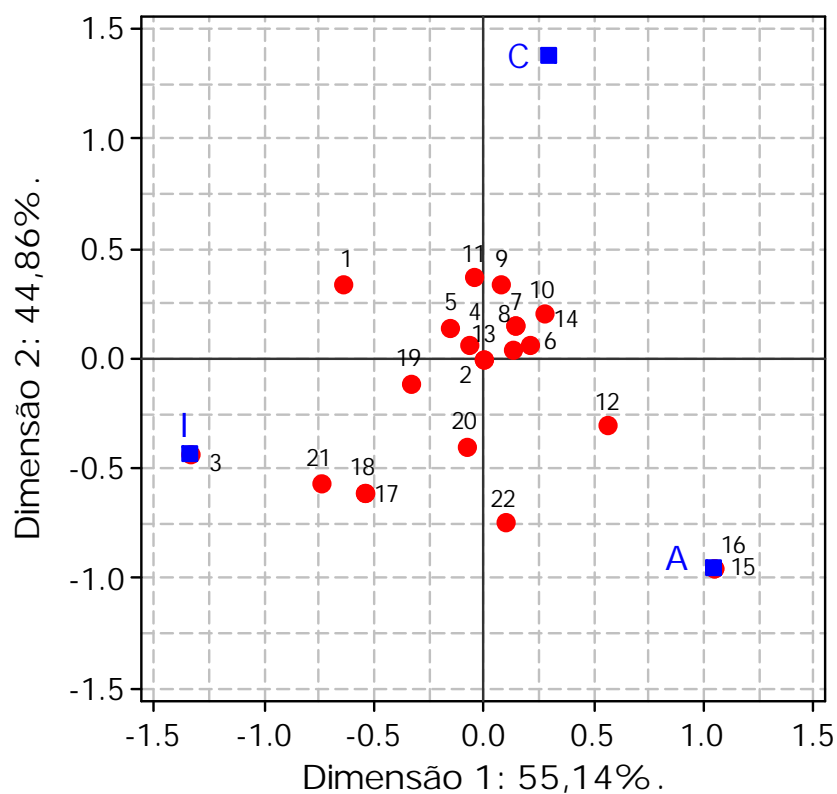


• **Legenda**

Posicionamento epitelial	1	Padrão de normalidade	13	Apical à JCE
Proliferação epitelial	2	Ausente ou leve	14	Intensa
Degeneração hidrópica	3	Ausente	15	Presente
Quantificação de células fibroblásticas gengivais	4	Quantidade padrão	16	Abundante
Presença de células inflamatórias interproximais	5	Ausente ou próximas ao epitélio juncional	17	Dispersas ou ocupando mais de 1/3 do tecido conjuntivo
Desorientação das fibras gengivais supracristais	6	Ausente	18	Presente
Contorno da crista óssea alveolar	7	Regular	19	Irregular
Lacunas de Howship	8	Ausente ou poucas	20	Muitas
Osteoclastos	9	Ausente	21	Presente
Quantificação de células fibroblásticas do ligamento periodontal	10	Quantidade padrão	22	Abundante
Desorientação das fibras do ligamento periodontal	11	Ausente	23	Presente
Perda de inserção das fibras do ligamento periodontal	12	Ausente	24	Presente

Figura 38 - Representação do perfil de distribuição das características histológicas em função dos subgrupos SHAM sem indução da doença periodontal.

Para o grupo OVZ, sem indução da doença periodontal, foram consideradas 22 características histológicas que variavam entre os subgrupos. A Figura 39 representa o perfil da distribuição das características para os subgrupos OVZ. Observou-se que as magnitudes para as distâncias foram respectivamente distância 1: 55,14% e distância 2: 44,86%, sendo que o subgrupo I foi melhor representado no eixo 1 (correlação de 0,922), seguido pelo subgrupo A (correlação de 0,601) os quais apresentaram perfis bastante distintos. Já o subgrupo C foi representado no eixo 1 (correlação de 0,947) se caracterizando como um grupo intermediário entre I e A. As características histológicas que respectivamente distinguiram o subgrupo A dos demais foram: 16, 15, 12 e 22 (considerando a frequência de células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo, quantidade abundante de fibroblastos no tecido conjuntivo gengival, migração apical do epitélio juncional, desorientação das fibras do ligamento periodontal, sendo estas características compatíveis com inflamação moderada a intensa). O subgrupo C não se distinguiu por nenhuma característica em especial, e para o subgrupo I foram as características: 3, 21, 18 e 17 (ausência de degeneração hidrópica, quantidade abundante de fibroblastos no ligamento periodontal, contorno da crista óssea irregular e fibras colágenas supracristal desorganizadas, na sua maioria compatíveis com inflamação moderada a intensa). As demais características apresentaram baixa variabilidade entre os subgrupos analisados.

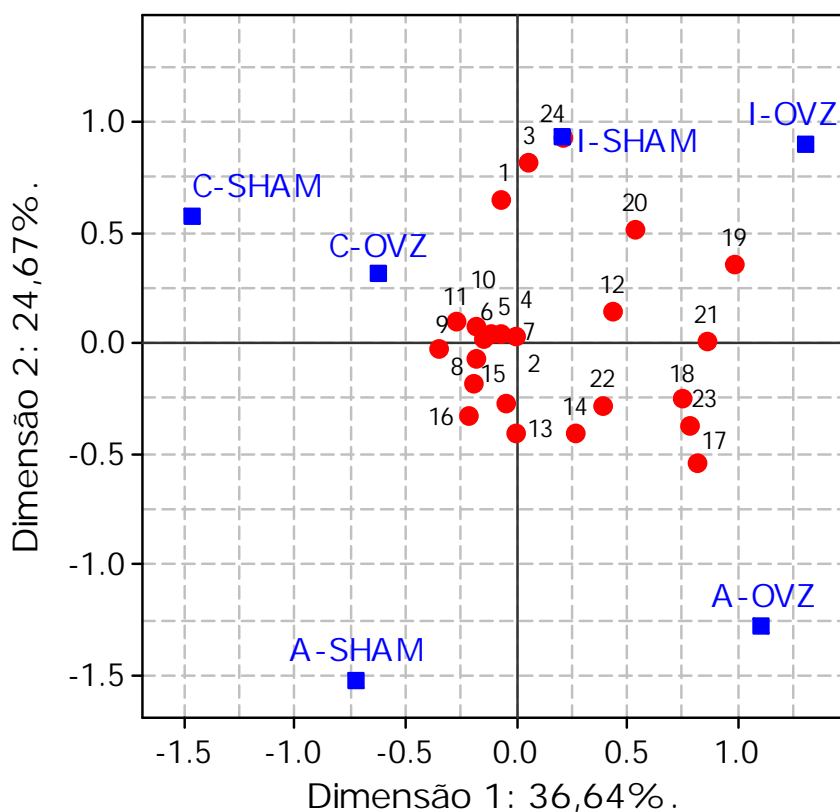


• **Legenda**

Posicionamento epitelial	1 Padrão de normalidade	12 Apical à JCE
Proliferação epitelial	2 Ausente ou leve	13 Intensa
Degeneração hidrópica	3 Ausente	14 Presente
Quantificação de células fibroblásticas gengivais	4 Quantidade padrão	15 Abundante
Presença de células inflamatórias interproximais	5 Ausente ou próximas ao epitélio juncional	16 Dispersas ou ocupando mais de 1/3 do tecido conjuntivo
Desorientação das fibras gengivais supracristais	6 Ausente	17 Presente
Contorno da crista óssea alveolar	7 Regular	18 Irregular
Lacunas de Howship	8 Ausente ou poucas	19 Muitas
Osteoclastos	9 Ausente	20 Presente
Quantificação de células fibroblásticas do ligamento periodontal	10 Quantidade padrão	21 Abundante
Desorientação das fibras do ligamento periodontal	11 Ausente	22 Presente

Figura 39 - Representação do perfil da distribuição das características histológicas em função dos subgrupos OVZ sem indução da doença periodontal.

A Figura 40 representa o perfil da distribuição das características para os subgrupos SHAM e OVZ, sem doença periodontal, considerando as 24 características histológicas que variavam entre os subgrupos em função dos eixos resultantes da análise de correspondência. Observa-se que os subgrupos estão bem distribuídos ao longo do eixo principal, refletindo suas diferenças sobre características histológicas específicas. Os subgrupos I (SHAM e OVZ) e C (SHAM e OVZ) são relativamente homogêneos enquanto que A (SHAM e OVZ) não foram representados pelas mesmas características histológicas, sendo que a deficiência hormonal e a dieta alcoólica influenciaram padrões histológicos representados pela presença de células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo e desorientação das fibras do ligamento periodontal.



• Legenda

Posicionamento epitelial	1	Padrão de normalidade	13	Apical à JCE
Proliferação epitelial	2	Ausente ou leve	14	Intensa
Degeneração hidrópica	3	Ausente	15	Presente
Quantificação de células fibroblásticas gengivais	4	Quantidade padrão	16	Abundante
Presença de células inflamatórias interproximais	5	Ausente ou próximas ao epitélio juncional	17	Dispersas ou ocupando mais de 1/3 do tecido conjuntivo
Desorientação das fibras gengivais supracristais	6	Ausente	18	Presente
Contorno da crista óssea alveolar	7	Regular	19	Irregular
Lacunas de Howship	8	Ausente ou poucas	20	Muitas
Osteoclastos	9	Ausente	21	Presente
Quantificação de células fibroblásticas do ligamento periodontal	10	Quantidade padrão	22	Abundante
Desorientação das fibras do ligamento periodontal	11	Ausente	23	Presente
Perda de inserção das fibras do ligamento periodontal	12	Ausente	24	Presente

Figura 40 - Representação do perfil da distribuição das características histológicas em função dos subgrupos SHAM e OVZ sem indução da doença periodontal.

5.2.3.2 Presença da doença periodontal

Os animais que tiveram a indução da periodontite por meio da ligadura de algodão apresentaram epitélio juncional achatado evidentemente migrado na direção apical à JCE. Este se apresentava, por vezes, ulcerado ou rompido, em virtude da metodologia adotada. As áreas preservadas mostravam-se proliferadas, com ninhos epiteliais em degeneração, presença de perda de adesão celular e degeneração hidrópica.

O tecido conjuntivo raramente exibia quadro inflamatório. Quase a totalidade dos animais apresentava feixes de fibras colágenas, com perda de orientação e hialinização; raramente se observava a “banda” de fibras colágenas dispostas paralelamente na região supracristal.

O ligamento periodontal estava modificado, constituído por tecido conjuntivo com fibras colágenas dispostas em diversas orientações, muitas vezes desorganizadas havendo perda de inserção.

A crista óssea inter-radicular exibiu aspecto bastante irregular; presença de crateras e lacunas de reabsorção, algumas vezes acompanhadas de células gigantes multinucleadas. Em alguns espécimes o osso alveolar tinha aspecto fragmentado, sugestivo de atividade de remodelação óssea, sendo também observada a separação da crista óssea inter-radicular em duas lâminas verticais unidas por uma faixa de tecido conjuntivo fibroso. As Figuras 41, 42, 43, 44, 45 e 46 exemplificam os seis grupos experimentais.

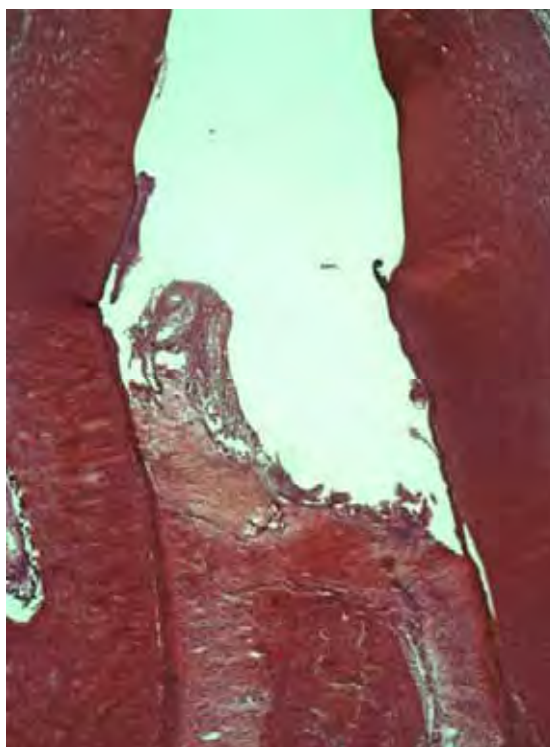


Figura 41 - Imagem representativa do grupo C-SHAM com indução da doença periodontal (HE, 100x).



Figura 42 - Imagem representativa do grupo C-OVZ com indução da doença periodontal (HE, 100x).



Figura 43 - Imagem representativa do grupo A-SHAM com indução da doença periodontal (HE, 100x).



Figura 44 - Imagem representativa do grupo A-OVZ com indução da doença periodontal (HE, 100x).

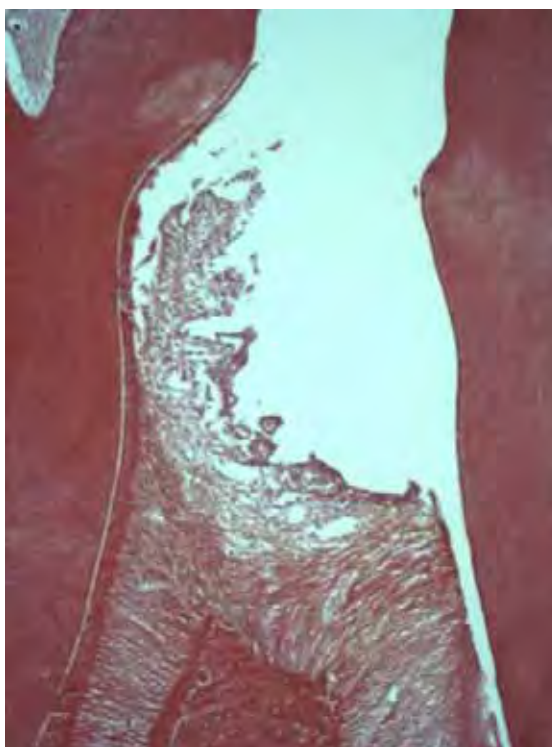


Figura 45 - Imagem representativa do grupo I-SHAM com indução da doença periodontal (HE, 100x).

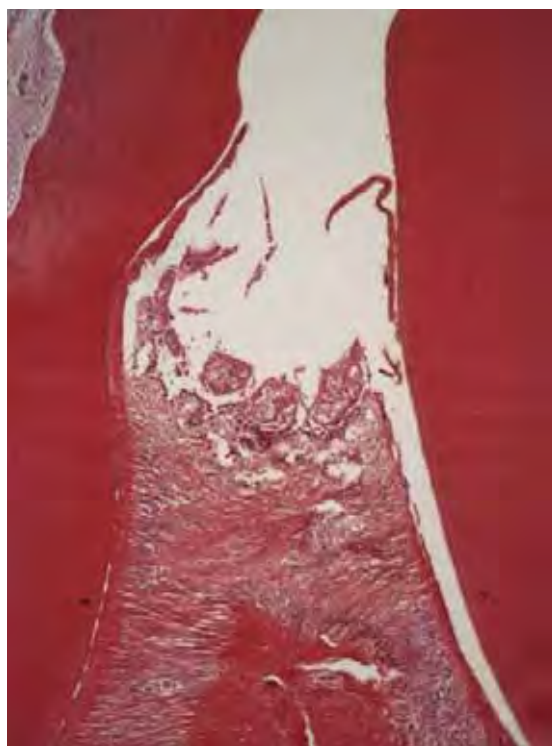


Figura 46 - Imagem representativa do grupo I-OVZ com indução da doença periodontal (HE, 100x).

O comportamento histológico para os seis grupos analisados foi apresentado no Quadro 3.

Quadro 3 - Comportamento histológico periodontal interproximal dos animais com indução da doença periodontal (*continua*)

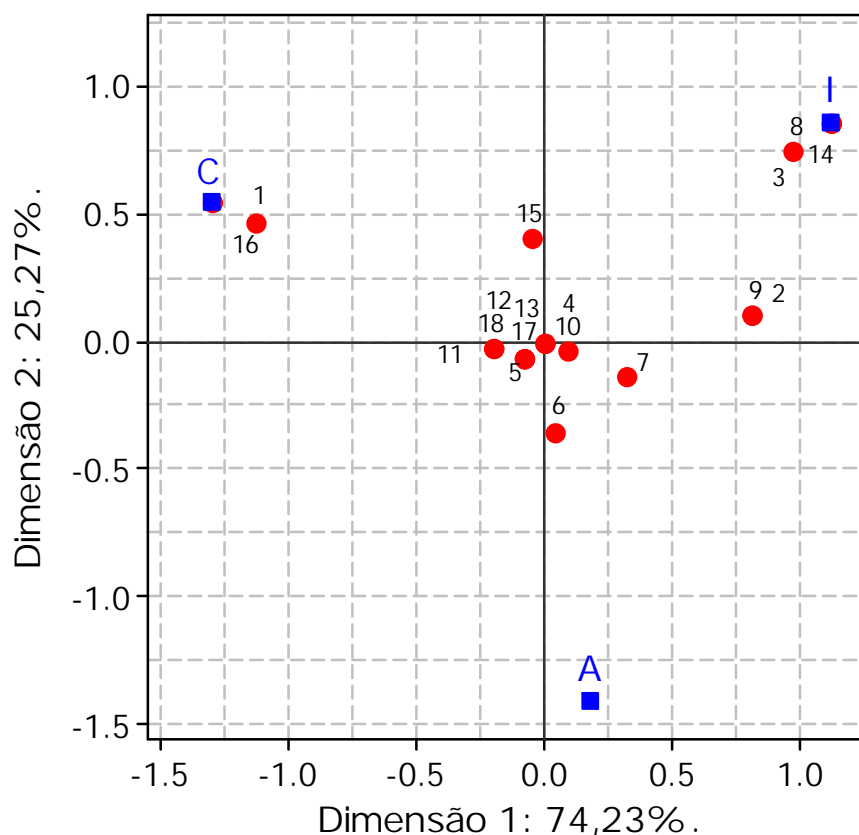
ANIMAIS COM DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA POR MEIO DE LIGADURA - DADOS EM %							
Características histológicas		SHAM			OVZ		
		C	A	I	C	A	I
EPITÉLIO	posicionamento do epitélio juncional						
	padrão de normalidade	0	0	0	0	0	0
	apical à JCE	100	100	100	100	100	100
	proliferação do epitélio juncional						
	ausente	0	0	0	0	0	0
	leve	20	0	0	0	0	0
	intensa	80	100	100	100	100	100
	degeneração hidrópica						
	ausente	0	0	0	0	0	0
presente	100	100	100	100	100	100	
TECIDO CONJUNTIVO GENGIVAL	quantificação de células fibroblásticas do tecido conjuntivo gengival						
	quantidade padrão	100	100	100	100	100	100
	abundante	0	0	0	0	0	0
	presença de células Inflamatórias interproximais						
	ausente	60	80	100	100	40	0
	próximas ao epitélio juncional	40	20	0	0	60	100
	dispersas no tecido conjuntivo	0	0	0	0	0	0
	mais de 1/3 do tecido conjuntivo	0	0	0	0	0	0
	hialinização das fibras gengivais supracristais						
	ausente	0	20	40	0	0	20
	presente	100	80	60	100	100	80
	desorientação das fibras gengivais supracristais						
	ausente	0	0	20	0	0	0
presente	100	100	80	100	100	100	

Quadro 3 - Comportamento histológico periodontal interproximal dos animais com indução da doença periodontal (*conclusão*)

	perda de inserção das fibras gengivais supracristais						
	ausente	20	20	20	0	40	20
	presente	80	80	80	100	60	80
OSSO ALVEOLAR	contorno da crista óssea alveolar						
	regular	0	0	0	0	0	0
	irregular	100	100	100	100	100	100
	lacunas de Howship						
	ausente	0	20	0	0	0	0
	poucas	100	80	80	100	20	20
	muitas	0	0	20	0	80	80
LIGAMENTO PERIODONTAL	osteoclastos						
	ausente	40	80	40	20	80	40
	presente	60	20	60	80	20	60
	quantificação de células do ligamento periodontal						
	quantidade padrão	40	100	100	100	80	100
	abundante	60	0	0	0	20	0
	desorientação das fibras do ligamento periodontal						
	ausente	0	0	20	0	0	0
	presente	100	100	80	100	100	100
	perda de inserção das fibras do ligamento periodontal						
ausente	0	20	40	0	40	0	
presente	100	80	60	100	60	100	

Os dados considerados representativos para o perfil dos subgrupos SHAM (C, A e I) e OVZ (C, A e I) foram separados para considerações relacionadas com ausência ou leve inflamação periodontal e condições relacionadas com moderada ou intensa inflamação periodontal e a análise de correspondência foi aplicada com a finalidade de visualizar os resultados.

Para o grupo SHAM, com indução da doença periodontal, foram consideradas 18 características histológicas que variavam entre os subgrupos. A Figura 47 representa o perfil da distribuição das características para os subgrupos. O eixo 1 foi considerado de maior projeção (74,23%) em relação ao eixo 2 (25,77%) sendo o subgrupo C melhor representado no eixo 2 (correlação de 0,943), seguido pelo subgrupo I (correlação de 0,831) os quais apresentaram perfis bastante distintos. Já o subgrupo A foi representado no eixo 1 (correlação de 0,954) se caracterizando como um grupo intermediário entre C e I. As características histológicas que respectivamente distinguiram o subgrupo C dos demais foram: 16 e 1 (quantidade abundante de células fibroblásticas do ligamento periodontal e leve proliferação do epitélio juncional) e para o subgrupo I foram: 8, 3, 14, 2 e 9 (fibras do tecido gengival supracristal orientadas paralelamente, fibras do ligamento periodontal bem orientadas, presença de muitas lacunas de Howship, ausência de hialinização de fibras colágenas supracristais e fibras do ligamento periodontal bem inseridas, na sua maioria compatíveis com ausência ou leve inflamação). O subgrupo A não apresentou características histológicas específicas com maior correlação com a característica 6 (ausência de osteoclastos). As demais características apresentaram baixa variabilidade entre os subgrupos analisados.



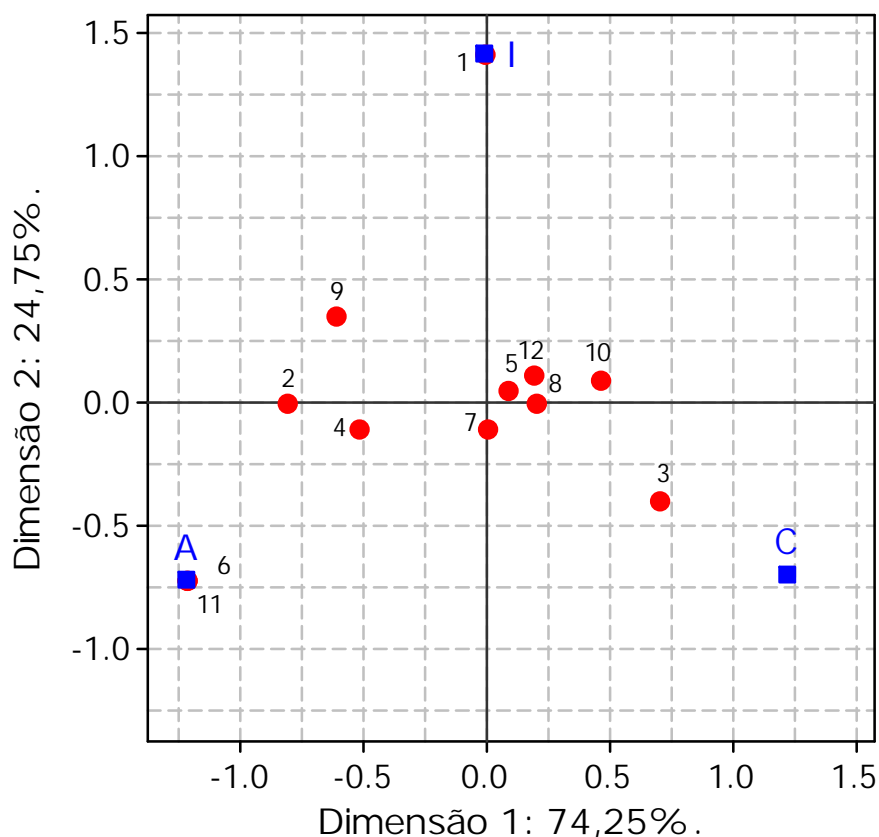
• Legenda

Proliferação epitelial	1	Ausente ou leve	10	Intensa
Hialinização das fibras colágenas gengivais	2	Ausente	11	Presente
Desorientação das fibras gengivais supracristais	3	Ausente	12	Presente
Inserção das fibras gengivais supracristais	4	Ausente	13	Presente
Lacunas de Howship	5	Ausente ou poucas	14	Muitas
Osteoclastos	6	Ausente	15	Presente
Quantificação de células fibroblásticas do ligamento periodontal	7	Quantidade padrão	16	Abundante
Desorientação das fibras do ligamento periodontal	8	Ausente	17	Presente
Perda de inserção das fibras do ligamento periodontal	9	Ausente	18	Presente

Figura 47 - Representação do perfil da distribuição das características histológicas em função dos subgrupos SHAM com indução da doença periodontal.

Para o grupo OVZ, com indução da doença periodontal, foram consideradas 12 características histológicas que variavam entre os subgrupos. A Figura 48 representa o perfil da distribuição das

características para os subgrupos. Foi verificado que o eixo 1 foi considerado de maior projeção (74,25%) em relação ao eixo 2 (24,75%), sendo que o subgrupo C foi melhor representado no eixo 1 (correlação de 0,900), seguido pelo subgrupo A (correlação de 0,893) os quais apresentaram perfis bastante distintos. Já o subgrupo I foi representado no eixo 2 (correlação de 0,667). As características histológicas que respectivamente distinguiram o subgrupo A dos demais foram: 2, 4, 6 e 11 (fibras colágenas gengivais inseridas em cimento, ausência de osteoclastos, quantidade abundante de fibroblastos no ligamento periodontal, compatíveis na sua maioria com ausência ou leve inflamação), para o subgrupo C foi a 3 (poucas lacunas de Howship), e para o subgrupo I foi a 1 (ausência de hialinização das fibras colágenas supracristais). As demais características apresentaram baixa variabilidade entre os subgrupos analisados.



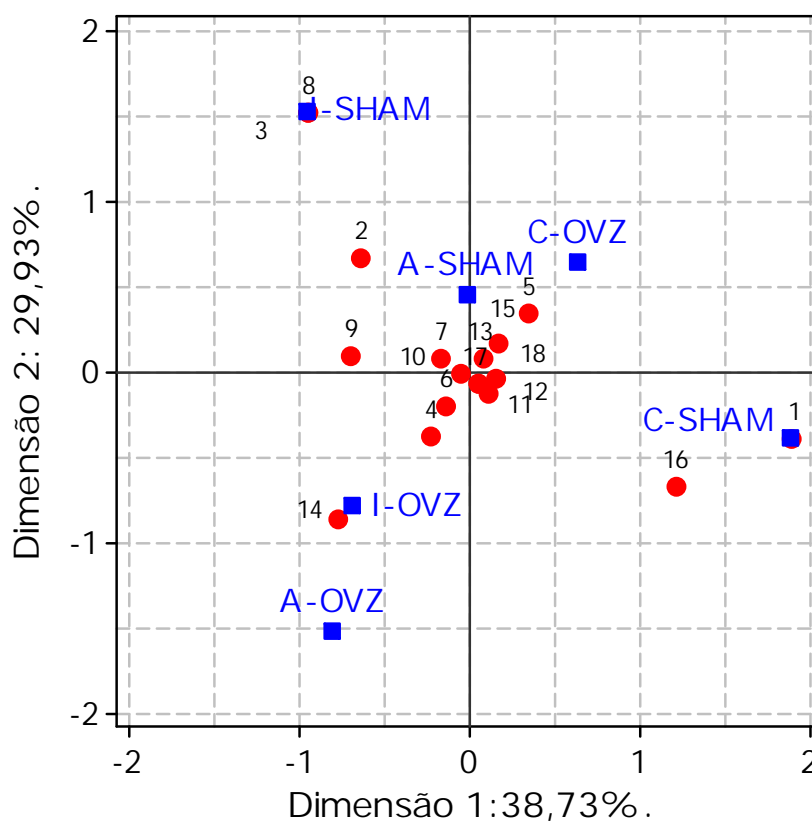
• **Legenda**

Hialinização das fibras colágenas gengivais	1 Ausente	7 Presente
Inserção das fibras gengivais supracristais	2 Ausente	8 Presente
Lacunas de Howship	3 Ausente ou poucas	9 Muitas
Osteoclastos	4 Ausente	10 Presente
Quantificação de células fibroblásticas do ligamento periodontal	5 Quantidade padrão	11 Abundante
Perda de inserção das fibras do ligamento periodontal	6 Ausente	12 Presente

Figura 48 - Representação do perfil da distribuição das características histológicas em função dos subgrupos OVZ com indução da doença periodontal.

A Figura 49 representa o perfil da distribuição dos subgrupos SHAM e OVZ, com doença periodontal, considerando as 18 características histológicas que variavam entre os subgrupos em função dos eixos resultantes da análise de correspondência. Observa-se heterogeneidade para a distribuição dos subgrupos ao longo do eixo principal, refletindo marcantes diferenças sobre características

histológicas. Apenas os subgrupos I-OVZ e A-OVZ são relativamente homogêneos, tendo como representação comum a presença de muitas lacunas de Howship, enquanto que os demais subgrupos não foram representados pelas mesmas características histológicas.



• Legenda

Proliferação epitelial	1 Ausente ou leve	10 Intensa
Hialinização das fibras colágenas gengivais	2 Ausente	11 Presente
Desorientação das fibras gengivais supracristais	3 Ausente	12 Presente
Inserção das fibras gengivais supracristais	4 Ausente	13 Presente
Lacunas de Howship	5 Ausente ou poucas	14 Muitas
Osteoclastos	6 Ausente	15 Presente
Quantificação de células fibroblásticas do ligamento periodontal	7 Quantidade padrão	16 Abundante
Desorientação das fibras do ligamento periodontal	8 Ausente	17 Presente
Perda de inserção das fibras do ligamento periodontal	9 Ausente	18 Presente

Figura 49 - Representação das características histológicas em função dos subgrupos SHAM e OVZ com indução da doença periodontal.

6 DISCUSSÃO

A identificação do alcoolismo feminino, em atendimentos primários, parece ser deficiente e desvalorizada. O que se observa é um crescente aumento do consumo abusivo do etanol com gastos desnecessários para o setor público, visto que esta patologia pode ser prevenida ou tratada e que, quando progressiva, implica em fraturas e uso de medicamentos para o controle das doenças sistêmicas associadas ao etanol.

Para se implantar programas de prevenção adequados para esta questão, é indispensável conhecer a realidade científica sobre as consequências para este assunto. Basicamente são necessários levantamentos populacionais gerais e específicos para o alcoolismo, indicadores estatísticos e estudos que indiquem o risco para uma maior probabilidade de um dano à saúde em longo prazo.

Segundo estudo de Galduróz et al. (2005) estimou-se que 68% da população brasileira já tenha consumido derivados do etanol, proporções próximas aos 70% do Chile e aos 80% dos Estados Unidos (EUA). Estes dados, associados a fatores que influenciam a dependência ao etanol, inclusive fatores genéticos (Zakari, 2006), aos danos teciduais diretos ou indiretos e patologias associadas (Santolaria et al., 2000; Al-Sanouri et al., 2005; Gonzáles-Reimers et al., 2005; Epstein et al., 2007; Seitz, 2007; Moe, 2008) assim como as consequências sociais negativas próprias da fase de dependência alcoólica (Addorolato et al., 1997; WHO, 1999; Santolaria et al., 2000), tornam o alcoolismo uma questão de saúde pública.

O impacto do consumo abusivo do etanol é frequentemente maior em mulheres jovens, causando dentre outras patologias, disfunção endócrina e reprodutiva (Angustynska et al., 2007). Entretanto, espera-se um aumento do impacto nas mulheres com maior idade nos próximos vinte anos, devido a maior expectativa de vida e maior probabilidade do sinergismo do etanol com fatores associados a pós-menopausa e medicamentos utilizados para o controle da ansiedade e depressão (Epstein et al., 2007).

A deficiência hormonal pós-menopausa, particularmente do estrógeno, está associada ao desenvolvimento de várias patologias, dentre estas osteoporose e doenças coronarianas (Friedlander, 2002). Assim como o alcoolismo, a osteoporose foi citada por vários estudos como um problema social devido a seus fatores sociais, físicos e impacto econômico (Anbinder et al., 2006; Häussler et al., 2007; Edwards; Mioglorati, 2008).

Embora alguns estudos sugiram que, para mulheres acima de sessenta anos, o consumo do etanol aumente o risco para o câncer, doenças hepáticas e neurocognitivas (Seitz, 2007), existem pesquisas que indicam que as mulheres, especialmente para aquelas que não fazem TRH, possam ser beneficiadas pelo consumo em baixa dosagem de etanol, contribuindo com a proteção de doenças coronarianas e osteoporose pelo aumento progressivo nos níveis de estrógeno (Gavaler et al., 2005; Epstein et al., 2007). Portanto, o consumo em baixa dosagem não pode ser considerado totalmente prejudicial.

Outra dificuldade é definir o que é baixa dosagem, visto que os efeitos variam conforme índice de massa corporal, medicamentos associados, tipo de bebida, momento e frequência da ingestão e presença de alimentos no estômago. Diante destas informações, sugere-se que a recomendação para o consumo em baixa dosagem por mulheres mais velhas seja feita com extrema precaução; sobretudo, se considerarmos a frequente associação entre o consumo do etanol e do tabaco.

Dentre a literatura revisada, alguns estudos demonstraram a relação positiva entre a osteoporose e a doença periodontal (Duarte et al., 2004; Amadei, 2007; Fujita et al., 2008), embora outros estudos demonstraram resultados conflitantes (Spalding, 2005; Anbinder et al. 2006; Lopes et al., 2008). O que se observou é que o mecanismo biológico e a relação direta entre estas duas doenças não estão bem definidos. Contudo, é importante ressaltar que é possível que outros fatores favoreçam esta correlação, como a baixa escolaridade e inadequada higienização, como sugeridas por Gomes-Filho (2007). Também é relevante que mesmo na ausência de benefícios da reposição estrogênica ou pela terapia com calcitonina (Duarte et al, 2004), a THP tem mostrado resultados significativos para a prevenção da doença periodontal frente à deficiência hormonal (Marques et al. 2003; Liu, 2009).

Em relação aos riscos do alcoolismo para o metabolismo ósseo e dano periodontal, existem indícios para efeitos diretos do etanol sobre osteoblastos e osteoclastos (Dai et al., 2000), como para a ativação de genes e vias correlacionados à osteogênese e osteoclastogênese (Himes et al., 2008; Callaci et al. 2009), porém os mecanismos celulares e moleculares não estão bem estabelecidos. Pouco se sabe sobre os efeitos diretos e expressões genéticas que determinam as características envolvidas com a perda óssea devido à idade, deficiência hormonal ou consumo excessivo do etanol, sendo que a significância destes dados para a remodelação óssea não é clara.

Considerando os vários estudos citados, o etanol apresenta direta ou indiretamente associação com a doença periodontal (Pitphat et al., 2003; Tsai et al. 2005; Souza, 2006; Yoshiara et al., 2008; Amaral et al., 2008; Irei et al., 2008) e somente poucos estudos relataram a falta desta associação (Jansson, 2008; Kongstad et al., 2008).

Dentre a literatura revisada, somente poucos estudos foram longitudinais (Pitphat et al., 2003; Jansson, 2008) o que impede a confirmação do alcoolismo como fator de risco para a doença periodontal.

Tal consideração se torna dificultada se considerado que a população incluída era completamente diferente para cada estudo, com possibilidade de interferências para fatores sociodemográficos, raciais, culturais. Para os estudos epidemiológicos longitudinais ou transversais, os dados relativos à frequência e tipo de bebida consumida foram auto-reportados, podendo estar super ou subestimados, e quando considerados em relação ao gênero como observado por Kongstad et al. (2008) soma-se ao fato de que homens apresentam maiores tendências a assumir o consumo de etanol que mulheres.

Segundo uma revisão crítica realizada por Amaral et al. (2008) entre os estudos indexados que relacionaram alcoolismo e doença periodontal, de 1530 estudos selecionados, somente 16 foram considerados relevantes para um estudo de risco embasado. Mesmo assim, ainda foram observadas divergências entre os parâmetros analisados e poucos estudos atendiam completamente a critérios importantes como elegibilidade, métodos de seleção dos participantes, critérios utilizados para definir consumo e dependência do etanol e critérios de diagnóstico periodontal. Muitas vezes fatores de risco como o fumo, o qual já é conhecido como modulador da doença periodontal, está associado ao consumo do etanol e pode ter interferido na condição periodontal. Assim, o etanol é, por enquanto, um provável fator de risco a ser confirmado por estudos longitudinais que, preferencialmente, demonstrem dados ajustados para idade, gênero, consumo de tabaco, *diabetes*, quantidade de biofilme dental e cálculo, frequência e tipo de bebida alcoólica consumida.

Diante da dificuldade de controlar tantas variáveis, a utilização de ratos como modelo de estudo para doenças periodontais tem sido proposta e aceita pela comunidade científica (Galvão et al., 2003; Marques et al., 2005; Anbinder et al. 2006; Souza, 2006; Irei et al., 2008).

Para o presente estudo foram utilizadas ratas com noventa dias de vida as quais foram consideradas sexualmente maduras,

portanto com o ciclo ovariano apresentando funções normais. De acordo com Sampson (1997), esta faixa etária corresponde ao adulto jovem quando relacionada ao humano.

A metodologia para indução de alterações prejudiciais no tecido ósseo, pela ovariectomia bilateral, também foi descrita por Tanaka et al. (2003); Duarte et al. (2004); Marques et al (2005); Anbinder et al. (2006); e Amadei (2007) e foi considerada adequada para este modelo experimental.

O tempo de espera entre a ovariectomia e o início do experimento foi de trinta dias e difere da sugestão de Amadei (2007), a qual preconiza o prazo de noventa dias. A proposta foi considerada apropriada, visto que o experimento foi considerado longo, sendo possível que fatores inerentes a senilidade das ratas SHAM pudessem interferir em nossos resultados. Além disso, segundo Tanaka et al. (2003) e Duarte (2004) é possível constatar perda óssea logo após a ovariectomia a qual diminui gradativamente, tendo fases de quiescências e exacerbação.

O modelo utilizado de periodontite induzida por meio da colocação de ligadura de algodão foi proposto por vários estudos citados nesta literatura (Galvão et al., 2003; Kuhr et al., 2004; Rodini, 2005 Souza, 2005, 2006; Amadei, 2007; Gaspersic et al., 2008; Irie et al., 2008) sendo considerado uma das opções adequadas para a proposta experimental.

Este trabalho utilizou a indução unilateral e o dente contralateral como controle, com o intuito de diminuir variáveis individuais, como por exemplo: peso, porcentagem de gordura corpórea, momento e frequência da ingestão do etanol e presença de alimentos no estômago. Outros estudos também utilizaram o mesmo animal para controle e observaram diferenças significativas para o sítio com a doença periodontal e sítio contralateral (Duarte et al. (2004); Souza 2006; Amadei, 2007). Também é importante considerar que a proposta incluiu avaliação da perda de inserção e resposta inflamatória local, assim análises que

pudessem interferir diretamente em nossos resultados, como dosagens séricas ou níveis de mediadores químicos não foram realizados. Deste modo foi desconsiderada a possibilidade da resposta inflamatória refletida na região contralateral, como discutido nos modelos propostos por El-Aleem et al. (2004) e Gaspersic et al. (2008).

No presente trabalho a doença periodontal foi induzida por um período de 56 dias. A literatura mostra diferentes tempos de indução da doença periodontal com ligadura, sendo relatados 6, 8, 16, 30, 56 e 60 dias (respectivamente Duarte et al., 2004; Galvão et al., 2003; Gaspersic et al., 2003; Amadei, 2007; Souza, 2006; Kuhr et al., 2004). Segundo Kuhr (2004) e Rodini (2005) um período de 15 dias seria suficiente para avaliar a inflamação gengival e a perda óssea alveolar, sendo que esta diminui gradativamente partir de 42 dias até a estagnação. A opção por manter a ligadura considerou estudos prévios quanto ao consumo crônico do etanol por oito semanas (Lieber, 2003; Rocha, 2005; Souza, 2006; Iwaniec, 2008) e mesmo utilizando um período de indução periodontal considerado longo por alguns autores, foi possível identificar processo inflamatório nos grupos experimentais como pode ser observado pela presença de proliferação epitelial, degeneração hidrópica, quantidade abundante de fibras do ligamento periodontal e tecido gengival, presença de células inflamatórias e lacunas de Howship.

Com relação à perda óssea vertical nas faces correspondente a localização da ligadura, a média interproximal das medidas correspondentes as faces mesial do primeiro molar e distal do segundo molar procuram compensar uma superestimativa de perda óssea ou de inserção.

A preocupação em observar a alteração de peso e o consumo nutricional dos animais experimentais deve-se ao fato de que, para alcoolistas crônicos a má nutrição, deficiência vitamínica e cirrose hepática avançada podem contribuir com alguma das anormalidades sistêmicas observadas na literatura revisada. Assim sendo, a opção pelo

grupo isocalórico excluiu a desnutrição como fator causal para as alterações encontradas e possibilitou a avaliação do efeito direto do etanol, o qual sabidamente é um potente modulador do sistema imune, gerando alterações inflamatórias neutrofílicas, leucocitárias e funções linfocitárias deficientes (Szabo, 1999).

Para este estudo, a perda ou ganho de peso foram significativamente condicionados à dieta experimental e castração. Assim, tanto a perda de peso observada para os animais com dieta alcoólica quanto para aqueles com dieta isocalórica refletiu a debilidade sistêmica associada aspecto nutricional. Em relação à castração, os efeitos decorrentes da deficiência estrogênica acentuaram as alterações de peso para animais OVZ (A e C) em relação aos animais SHAM (A e C).

Embora o presente estudo não tenha proposto a avaliação sérica dos níveis de estrógeno ou avaliação macroscópica quanto à atrofia uterina, o ganho de peso significativo observado para animais OVZ-C em relação ao grupo SHAM-C indicaram o sucesso da ovariectomia; especialmente se considerado que estes grupos não apresentaram diferenças significativas para o peso inicial e que o grupo SHAM-C consumiu significativamente mais calorias que o grupo OVZ-C.

Considerando que nos grupos SHAM os subgrupos A e I tiveram consumos calóricos proporcionais, torna-se interessante o fato de que animais SHAM-I perderam significativamente mais peso que animais SHAM-A. Dentro desta mesma proposta de dieta, alterações semelhantes foram observadas por Rocha (2005).

Ressalta-se ainda que, segundo Nicolás et al. (2000), o etanol é uma substância depressora do sistema nervoso central, deixando o animal letárgico, e possivelmente respondeu pelo menor consumo e gasto de calorias em relação ao controle. Uma vez que o subgrupo isocalórico consumiu o mesmo valor energético do que o álcool e que neste grupo possa ter ocorrido um dano menos significativo ao SNC, sem a letargia observada para o subgrupo álcool, o gasto energético não foi

compensado pelo consumo calórico, resultando em uma perda maior de peso para este subgrupo.

Para a ausência de significância entre os animais isocalóricos ou álcool com deficiência hormonal, é possível que o alto desvio-padrão tenha interferido nas respostas e a significância observada para o grupo SHAM (A e I) se repetisse no grupo OVZ (A e I). Esta hipótese é favorecida com os achados de García-Valdecasas-Campelo et al. (2007), onde se verificou que os danos causados no SNC estariam mais associados a quantidade de etanol consumida do que aos hormônios sexuais.

Os pontos de referências para as análises histomorfométricas (JEC à COA e JCE à porção apical do epitélio juncional) foram baseados em estudos prévios (Gaspersic et al., 2003; Liu et al. 2006; Irie et al., 2008) e permitiram visualizar a perda óssea e perda de inserção total, não implicando se a doença estava estagnada ou ativa.

Já a análise de correspondência foi utilizada para comparar quais características histológicas pudessem distinguir os subgrupos experimentais no fim do experimento. Apesar de não estabelecer a significância estatística das associações e não avaliar o efeito independente de cada característica, este método combina vantagens de métodos não lineares e de métodos multidimensionais, o que permitiu a descrição das características de baixa dispersão ou variabilidade nos subgrupos e a identificação de características diferenciadas.

Em relação à osteopenia ou osteoporose, como agravante para a doença periodontal, foi observado que a perda óssea não foi considerada significativa entre animais SHAM-C e OVZ-C sem ou com a indução da doença periodontal. Resultados semelhantes para perda óssea foram observados por Marques et al. (2005) e Anbinder et al. (2006),

O comportamento histológico, observado pela análise de correspondência, demonstrou que animais SHAM-C e OVZ-C sem indução da doença periodontal tiveram perfis histológicos semelhantes enquanto os animais SHAM-C e OVZ-C com a doença periodontal apresentaram perfis distintos, marcados especialmente pela presença abundante de fibroblastos no ligamento periodontal para animais OVZ. A presença de osteoclastos em todos os grupos pode apenas estar associada com a atividade de reabsorção comum em roedores.

Com base em nossos resultados, este estudo reforça os achados de que a deficiência hormonal não foi capaz de induzir ou agravar a perda óssea na doença periodontal, mas pode acarretar alterações inflamatórias importantes, provavelmente pela ação de citocinas estimuladas pela deficiência hormonal ou pelo acúmulo de biofilme dental associado à ligadura de algodão.

Para a consideração do etanol como fator modulador para a doença periodontal, os resultados demonstraram que na ausência da doença periodontal houve influência da dieta alcoólica para ratas com e sem deficiência estrogênica, havendo perda óssea significativa para o subgrupo A em relação aos subgrupos I e C. Também se observou que a castração interferiu para os grupos com deficiência nutricional, induzido uma maior perda óssea, assim os subgrupos A e I apresentaram perda óssea significativa quando associados à ovariectomia.

Os valores para IPI sugeriram que a deficiência nutricional foi capaz de induzir perda de inserção somente para animais SHAM, com menores valores para IPI para animais C em relação ao subgrupo A e subgrupo I.

A análise de correspondência permitiu observar que, para animais sem a doença periodontal, o etanol induziu modificações histológicas específicas com maior severidade da inflamação para o grupo com deficiência hormonal. A deficiência hormonal associada à dieta alcoólica influenciou padrões histológicos representados pela presença de

células inflamatórias dispersas no tecido conjuntivo e pela desorientação das fibras do ligamento.

Estes resultados concordam parcialmente com os resultados de Irie et al. (2008) no qual foi observado maiores valores para perda óssea alveolar, perda de inserção e densidade de polimorfonucleares para o grupo álcool em relação ao grupo isocalórico mesmo na ausência de indução da doença periodontal.

Não foi possível confirmar o sinergismo entre o etanol e a deficiência hormonal na ausência da doença periodontal, mas evidenciou-se um comportamento negativo para a perda óssea e processo inflamatório quando estas variáveis estavam associadas.

Já frente à indução da doença periodontal, foi observada para os grupos SHAM e OVZ, menor perda óssea para o subgrupo C em relação aos subgrupos A e I, e nenhuma diferença significativa para os valores de IPI quando os subgrupos foram considerados. Assim considerou-se que o etanol por si, não induziu alterações específicas apresentando muitas características comuns aos grupos isocalóricos correspondentes.

Considerou-se que a deficiência nutricional observada para os subgrupos A e I SHAM e OVZ, foi responsável pela maior reabsorção óssea alveolar. Essa consideração se fortalece quando a ovariectomia é considerada, apresentando um padrão histológico homogêneo entre A-OVZ e I-OVZ marcados especialmente por muitas lacunas de Howship.

Em relação à perda óssea e perda de inserção para a combinação da doença periodontal e etanol, nossos resultados concordam com os estudos de Irie et al (2008) onde foi verificado que o etanol não agravou a perda óssea e perda de inserção periodontal. Comportamento que, neste estudo, não foi alterado pela deficiência hormonal.

Em relação às características inflamatórias, foram observadas características histológicas distintas entre animais com deficiência hormonal SHAM e OVZ, sendo que a deficiência hormonal implicou em uma inflamação moderada a intensa para animais OVZ em relação a SHAM.

Os dados obtidos sugerem que o consumo crônico do etanol 20% não teve efeitos benéficos para ratas ovariectomizadas como sugerido por Seitz (2007), assim provavelmente a dosagem foi moderada a alta e o restabelecimento dos níveis de estrogênio não foi beneficiado pelo etanol, o que refletiu no agravamento da perda óssea para ratas OVZ-A em relação a ratas SHAM-A para ausência da doença periodontal. Novas pesquisas com a mensuração dos níveis endógenos de estrógenos e menores concentrações de etanol poderiam confirmar tal possibilidade.

Não foi possível identificar quais os mecanismos que alteraram o padrão quando a doença periodontal foi combinada, mas é possível que a presença de patógenos periodontais tenha interferido na resposta celular e segundo Irie et al (2008) o grau de efeitos deletérios para o etanol difere de acordo com os tipos celulares. Pesquisas com marcadores imunoistoquímicos poderiam auxiliar nesta interpretação. Também é relevante considerar que a inflamação observada na patologia periodontal e provavelmente, preponderante a inflamação decorrente no etanol associado à ovariectomia e por isso o comportamento diferente para sítios com e sem indução da doença periodontal quando considerada a toxicidade do etanol.

Mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo que difere os efeitos combinados do etanol e deficiência estrogênica para a severidade da doença periodontal.

Mesmo considerando as questões que ainda precisam ser esclarecidas, existe uma plausibilidade biológica que explica o efeito do etanol nos tecidos periodontais. Também é relevante que as fraturas fazem parte de ambas as condições de osteoporose (Edwards;

Mioglorati, 2008) e alcoolismo (González-Reimers et al., 2005) e resultam em um declínio funcional e na qualidade de vida. Portanto pressupõe-se que a dificuldade motora e estímulo para a higienização oral diminuam, sendo estes fatores de contribuição para o acúmulo do biofilme dental, o qual associado à debilidade nutricional certamente irá interferir na progressão da doença periodontal.

Portanto, mesmo diante de resultados que não confirmem a osteoporose e alcoolismo como moduladores de risco para a doença periodontal, estes merecem atenção, supervisão, cuidados médicos e odontológicos, não apenas para o alívio dos sintomas apresentados, mas também para o diagnóstico precoce e a prevenção das doenças que, assim como o alcoolismo e osteoporose, apresentam implicações sobre a remodelação óssea.

Não se pode esquecer que os fatores de risco frequentemente agrupam-se no mesmo indivíduo e a abordagem de fatores específicos resulta na promoção de saúde geral.

7 CONCLUSÃO

Concluiu-se o consumo de etanol 20% não influenciou a perda óssea e perda de inserção decorrentes da periodontite induzida em ratas com deficiência estrogênica.

Foi observada para os animais com deficiência hormonal a contribuição da carência nutricional para a severidade da inflamação periodontal.

Na ausência da doença periodontal evidenciou-se perda óssea e processo inflamatório quando o etanol 20% e a deficiência hormonal estavam associados.

REFERÊNCIAS

Addolorato G, Capristo E, Greco AV, Stefanini GF, Gasbarrini G. Energy expenditure, substrate oxidation, and body composition in subjects with chronic alcoholism: new findings from metabolic assessment. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997 Sep;21(6):962-7.

Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2002;29:177-206.

Al-Sanouri I, Dikin M, Soubani AO. Critical care aspects of alcohol abuse. *South Med J*. 2005;98(3):372-81.

Amadei SU. Efeito de diferentes tempos de deficiência estrogênica na perda óssea resultante da periodontite experimental em ratas. [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2007.

Amaral CdaSF, Luiz RR, Leão ATT. The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *J Periodontol*. 2008;79(6):993-8.

Amaral CdaSF, Vettore MV, Leão A. The relationship of alcohol dependence and alcohol consumption with periodontitis: a systematic review. *J Dent*. 2009;37(9):643-51.

Anbinder AL, Prado MA, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, Rocha RF. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats – a radiographic and macroscopic study. *Braz Dent J*. 2006;17(3):201-07.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors. Bibliographic Services Division. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals: sample references [homepage na Internet]. Bethesda: US National Library; c2003 [disponibilidade em 2006 fev; citado em 20 mar.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Augustyńska B, Ziółkowski M, Odrowaz-Sypniewska G, Kiełpiński A, Gruszka M, Kosmowski W. Menstrual cycle in women addicted to alcohol during the first week following drinking cessation - Changes of sex hormones levels in relation to selected clinical features. *Alcohol Alcohol*. 2007;42(2):80-3.

Calder PC, Kew S. The immune system: a target for functional foods? *Br J Nutr*. 2002;88: Suppl 2:S165-77. Review.

Callaci JJ, Himes R, Lauing K, Wezeman FH, Brownson K. Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. *Calcif Tissue Int*. 2009;84(6):474-84.

Cheschin A. Avaliação dos níveis de interleucina 1 β em mulheres com doença periodontal e menopausa. [dissertação]. Universidade de Taubaté; 2003.

Crews FT, Bechara R, Brown LA, Guidot DM, Mandrekar P, Oak S, et al. Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2006;30(4):720-30.

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*. 2000;106(7):887-95.

Dettling A, Skopp G, Graw A, Haffner HT. The influence of sex hormones on the elimination kinetics of ethanol. *Forensic Sci Int*. 2008;177(2-3):85-9.

Duarte PM, Golçalves PF, Sallum EA, Casati MZ, Nociti Jr FH. Effect of an estrogen-deficient state and its therapy on bone loss resulting from an experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res*. 2004;39:107-10.

Edwards BJ, Migliorati CA. Osteoporosis and its implications for dental patients. *JADA*. 2008;139:545-52.

El-Aleem SAA, Morales-Aza BM, Donaldson LF. Sensory neuropeptide mRNA up-regulation is bilateral in periodontitis in the rat: a possible neurogenic component to symmetrical periodontal disease. *Eur J Neurosci*. 2004;19(3):650-8.

Epstein EE, Fischer-Elber K, Al-Otaiba Z. Women, aging, and alcohol use disorders. *J Women Aging*. 2007;19(1-2):31-48.

Faloni APS, Cerri PS. Mecanismos celulares e moleculares do estrogênio na reabsorção óssea. *Rev Odontol UNESP*. 2007;36(2):181-88.

Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res*. 2007;21(3):216-21.

Friedlander AH. The physiology, medical management and oral implications of menopause. *J Am Dent Assoc*. 2002;133(1):73-81.

Fujita S, Kikuchi T, Sobue T, Suzuki M, Koide M, Noguchi T. Lipopolysaccharide-mediated enhancement of bone metabolism in estrogen-deficient mice. *J Periodontol*. 2008;79(11):2173-81.

Galduróz JCF, Noto AR, Nappo SA, Carlini EA. Uso de drogas psicotrópicas no Brasil: pesquisa domiciliary envolvendo as 107 maiores cidades do país – 2001. *Rev Latino-am Enfermagem*. 2005;13:888-95

Galvão MP de A, Chapper A, Rosing CK, Ferreira MBC, Souza MAL. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(1):56-62.

García-Valdecasas-Campelo E, González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, De La Vega-Prieto MJ, Milena-Abril A, Sánchez-Perez MJ, et al. Brain atrophy in alcoholics: relationship with alcohol intake; liver disease; nutritional status, and inflammation. *Alcohol Alcohol*. 2007;42(6):533-8.

Gaspersic R, Stiblar-Martincic D, Osredkar J, Skaleric U. Influence of subcutaneous administration of recombinant TNF-alpha on ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodont Res*. 2003;38(2):198-203.

Gaspersic R, Kovacic U, Cör A, Skaleric U. Unilateral ligature-induced periodontitis influences the expression of neuropeptides in the ipsilateral and contralateral trigeminal ganglion in rats. *Arch Oral Biol*. 2008Jul;53(7):659-65. Epub 2008 Mar 17.

Gavaler JS. Should we consider an acceptable drinking level specifically for postmenopausal women? Preliminary findings from the postmenopausal health disparities study. *Alcohol Alcohol*. 2005;40(5):469-73.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol*. 1996 Oct;67(10 Suppl):1041-9. Review.

Gemmell E, Yamazaki K, Seymour GJ. Destructive periodontitis lesions are determined by the nature of the lymphocytic response. *Crit Rev Oral Bio Med*. 2002;13(1):17-34.

Gomes-Filho IS, Passos J de S, Cruz SS, Vianna MI, Cerqueira Ede M, Oliveira DC, dos Santos CA, Coelho JM, Sampaio FP, Freitas CO, de Oliveira NF. The association between posmenopausal osteoporosis and periodontal disease. *J Periodontol*. 2007;78(9):1731-40.

González-Quintela A, Dominguez-Santalla MJ, Perez LF, Vidal C, Lojo S, Barrio E. Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10 and IL-12. *Cytokine*. 2000;12(9):1437-40.

González-Reimers E, García-Valdecasas-Campelo E, Santolaria-Fernández F, Milena-Abril A, Rodríguez-Rodríguez E, Martínez-Riera A, et al. Rib fractures in chronic alcoholic men: Relationship with feeding habits, social problems, malnutrition, bone alterations, and liver dysfunction. *Alcohol*. 2005;37(2):113-7.

Himes R, Wezeman FHC, Callaci JJ. Identification of Novel Bone-Specific Molecular Targets of Binge Alcohol and Ibandronate by Transcriptome Analysis. *Alcohol Clin Exp Res*. 2008;32(7):1167–180.

Irie K, Tomofuji T, Tamaki N, Sanbe T, Ekuni D, Azuma T, et al. Effects of Ethanol Consumption on Periodontal Inflammation in Rats. *J Dent Res*. 2008;87(5):456-60

Iwaniec UT, Trevisiol CH, Maddalozzo GF, Rosen CJ, Turner RT. Effects of low-dose parathyroid hormone on bone mass, turnover, and ectopic osteoinduction in a rat model for chronic alcohol abuse. *Bone*. 2008;42(4):695-701.

Jansson L. Association between alcohol consumption and dental health. *J Clin Periodontol*. 2008;35(5): 379–84. Epub 2008 Mar 12.

Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006;169(3):987-98.

Khocht A, Janal M, Schleifer S, Keller S. The influence of gingival margin recession on loss of clinical attachment in alcohol-dependent patients without medical disorders. *J Periodontol*. 2003;74(4):485-93.

Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):54-64.

Kongstad J, Hvidtfeldt UA, Grønbaek M, Jontell M, Stoltze K, Holmstrup P. Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Periodontol*. 2008;35(12):1032-9.

Kovacs EJ, Messingham KA. Influence of alcohol and gender on immune response. *Alcohol Res Health*. 2002;26(4):257-63.

Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmall H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontol Res*. 2004;39(2):101-6.

Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. *Alcohol Res Health*. 2003;27(3):220-31. Review

Liu R, Bal HS, Desta T, Krothapalli N, Alyassi M, Luan Q, et al. Diabetes enhances periodontal bone loss through enhanced resorption and diminished bone formation. *J Dent Res* 2006;85(6):510-4.

Liu, J Cao Z, Li C. Intermittent PTH administration: A novel therapy method for periodontitis-associated alveolar bone loss. *Med Hypotheses*. 2009;72(3):294-6. Epub 2008 Nov 30.

Lopes FF, Loureiro FH, Alves CM, Pereira Ade F, Oliveira AEF. Densidade mineral óssea sistêmica vs situação clínica periodontal: estudo transversal em mulheres na pós menopausa. *Rev Ass Med Bras*. 2008;54(5):411-4.

Marques MR, da Silva MA, Manzi FR, Cesar-Neto JB, Nociti FH Jr, Barros SP. Effect of intermittent PTH administration in the periodontitis-associated bone loss in ovariectomized rats. *Arch Oral Biol*. 2005;50(4):421-9. Epub 2004 Dec 8.

Moe SM. Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care*. 2008 Jun;35(2):215-37.

Morse RM, Flavin DK. The definition of alcoholism. The joint committee of the national council on alcoholism and drug dependence and the American Society of Addiction Medicine to study the definition and criteria for the diagnosis of alcoholism. *JAMA*. 1992 Aug 26;268(8):1012-4.

Mukamal KJ, Chiuve SE, Rimm EB. Alcohol consumption and risk for coronary heart disease in men with healthy lifestyles. *Arch Intern Med*. 2006 Oct 23;166(19):2145-50.

Naveau S, Balian A, Capron F, Raynard BR, Fallik D, Agostini H, et al. Balance between pro and anti-inflammatory cytokines in patients with acute alcoholic hepatitis. *Gastroenterol Clin Biol*. 2005;29(3):269-74.

Nicolás JM, Fernández-Sola J, Robert J, Antúnez E, Cofán M, Cardenal C, et al. High ethanol intake and malnutrition in alcoholic cerebellar shrinkage. *QJM*. 2000;93(7):449-56.

Nimiec BA. Periodontal disease. *Top Companion Anim Med*. 2000;23(2):81-90. Review.

Novaes C, Melo NR, Bronstein MD, Zilberman ML. Impacto do alcoolismo em mulheres: repercussões clínicas. *Rev. Psiquiatr. Clin*. 2000;27(1):16-21.

Paquette DW. The concept of "risk" and emerging discipline of periodontal medicine. *J Comtemp Dent Pract*. 1999;1(1):1-18.

Pitiphat W, Merchant AT, Rimm EB, Joshipura KJ. Alcohol consumption increases periodontitis risk. *J Dent Res*. 2003;82(7):509-13.

Rocha RF. Influência do consumo crônico de álcool no fêmur de ratos machos e fêmeas. [tese de livre docência]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2005.

Rodini CO. Doença periodontal inflamatória induzida por ligadura: caracterização microscópica e estudo da presença de mastócitos e das enzimas óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e metaloproteinases -2 e -9. [dissertação] Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru, USP; 2005.

Rodini CO, Batista AC, Dionisio TJ, Santos CF, Cunha FQ, Lara VS. Morphologic evaluation and expression of matrix metalloproteinases-2 and 9 and nitric oxide during experimental periodontal disease in rat. *J Mol Hist*. 2008;39(3):275-82.

Sampson HW. Alcohol consumption by young actively growing rats: a histomorphometric study of cancellous bone. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997 Apr.; 21(2):352-9.

Santolaria F, Perez-Manzano JL, Milena A, González-Reimers E, Gomez-Rodriguez MA, Martinez-Riera A, et al. Nutritional assessment in alcoholic patients. Its relationship with alcoholic intake, feeding habits, organic complications and social problems. *Drug Alcohol Depend*. 2000;59(3):295-304.

Schreiber A. Alcoholism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92(2):127-31. Review.

Seitz HK, Becker P. Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Res Health*. 2007; 30(1):38-41, 44-7. Review.

Souza DM. Efeito do consumo crônico do álcool na periodontite induzida experimentalmente em ratos. [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista; 2006.

Souza DM, Rosa LP, Ricardo LH, Moraes LC, Rocha RF. Avaliação óssea alveolar de *rattus norvegicus* por meio dos métodos radiográfico e morfométrico. *Cienc Odontol Bras*. 2005;8(4):77-84.

Spalding M. Efeito da reposição hormonal com estrógeno em diferentes períodos após a ovariectomia na evolução da periodontite induzida em ratas. [tese] São José dos Campos; Faculdade de Odontologia de São José dos Campos: Universidade Estadual Paulista; 2005.

Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol*. 1999;34(6):830-41.

Tanaka M, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H, Ejiri S. Long-term changes in trabecular structure of aged rat alveolar bone after ovariectomy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(4):495-502.

Thorne CE. Osteoporosis: consideraciones diagnósticas y terapéuticas. *Rev Med Hered*. 2004;15(2):101-107.

Tsai IS, Tsai CC, Ho YP, Ho KY, Wu YM, Hung CC. Interleukin-12 and interleukin-16 in periodontal disease. *Cytokine*. 2005;31(1):34-40.

Wallock-Montelius LM, Villanueva JA, Chapin RE, Conley AJ, Nguyen HP, Ames BN, et al. Chronic ethanol perturbs testicular folate metabolism and dietary folate deficiency reduces sex hormone levels in the Yucatan micropig. *Biol Reprod*. 2007;76(3):455-65.

World Health Organization (WHO). Global status report on alcohol. Geneva: WHO;1999.

Yoshihara A, Watanabe R, Hanada N, Miyazaki H. A longitudinal study of the relationship between diet intake and dental caries and periodontal disease in elderly Japanese subjects. *Gerodontology*. 2009Jun;26(2):130-6

Zakhari S. Overview: How is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health*. 2006;29(4):245-54.

Zhu QL, Emanuele MA, LaPaglia N, Kovacs EJ, Emanuele NV. Vitamin E prevents ethanol-induced inflammatory, hormonal, and cytotoxic changes in reproductive tissues. *Endocrine*. 2007;32(1):59-68.

Zhu QL, Emanuele MA, LaPaglia N, Kovacs EJ, Emanuele NV. Vitamin E prevents ethanol-induced inflammatory, hormonal, and cytotoxic changes in reproductive tissues. *Endocrine*. 2007;32(1):59-68.

Anexo A – Certificado do comitê de ética em pesquisa

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dimas
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028
Fax: (12) 3947-9010 / uech@focjoc.unesp.br

 **CERTIFICADO**
Comitê de Ética em Pesquisa-Local

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 01/2007-PA/CEP, sobre “Influência do consumo crônico de álcool a 20% no periodonto de ratos com deficiência hormonal”, sob a responsabilidade de **JULIANA MADUREIRA DE SOUZA LIMA ALONSO**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 12 de fevereiro de 2007.



Prof. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local

Alonso JMSL. Influence of chronic consumption of ethanol 20% in induced periodontal disease of rats with estrogen deficiency [doctorate thesis] São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2009.

ABSTRACT

The immune system has an important paper in pathogenesis of the periodontal disease, being the host can modulate periodontal inflammatory reaction, determining variance to individual susceptibility and speed of progression of the periodontal disease. Amongst systemic acquired factors, osteoporosis and alcoholism are described in the literature, as risk indicators for bone loss associated with periodontal disease. The purpose of this study was evaluate histological and histomorfometrics aspects on influence of the chronic alcohol consumption in the ligature-induced periodontitis in rats with estrogen deficiency for. Sixty rats were used, with approximately 90 days-old, divided into two groups correlated surgery (OVZ) or surgical simulation of ovariectomy (SHAM). Each group was divided into three subgroups groups (C) control diet, (A) ethanol 20% containing liquid diet and (I) par-fed control diet. After thirty days of castration, diet and experimental periodontitis induction, which were maintained by 56 days. Interproximal regions between first and second molar lower left and the respective contralateral site without induction of periodontal disease were assessed as to the level osseous insertion loss and inflammatory characteristics. The results showed that in relation to the significance to SHAM-C and OVZ-C, hormone deficiency was not able to induce or aggravate the bone loss, but periodontitis has resulted in important inflammatory changes. Whereas the groups SHAM and OVZ and the absence of periodontitis, ethanol has resulted in bone loss and inflammatory changes to both groups, and also greater severity when combined with ovariectomy. In rats periodontitis induction, OVZ or SHAM, the 20% ethanol consumption doesn't affect exacerbate bone loss and periodontal insertion loss. Was greatest contribution of nutritional deficiency (A and I) for the severity of inflammation periodontal when combined with disabilities estrogen.

Keywords: Alcoholism. Osteoporosis. Periodontal disease. Ovariectomy.