



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

**Nathália Januario de Araujo**

**Avaliação da Fosfatase Alcalina em Ratos  
Alcoolizados Portadores de Periodontite  
Experimental**

**Araçatuba – SP**

**2014**

**Nathália Januario de Araujo**

**Avaliação da Fosfatase Alcalina em Ratos  
Alcoolizados Portadores de Periodontite  
Experimental**

**Trabalho de Conclusão de Curso como parte  
dos requisitos para a obtenção do título de  
Graduação em Odontologia da Faculdade de  
Odontologia de Araçatuba, Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.**

**Orientador: Prof. Ass. Dr. Juliano  
Milanezi de Almeida**

**Araçatuba – SP  
2014**

# Dedicatória

*Ofereço esta conquista à **Deus**, por me dar força, saúde, iluminar meus caminhos e me proporcionar o melhor que eu sempre sonhei, à minha mãe **Maria Madalena Januario**, por ser minha maior inspiração, a mulher mais dedicada e guerreira que conheço, que não mede esforços por mim com seu amor incondicional, às minhas tias **Albertina e Izabel Januario**, por toda dedicação e amor que me deram durante toda minha vida, ao meu irmão **Samuel Januario**, por toda proteção e amizade que me oferece, “desde sempre pra sempre”, e ao meu companheiro **Lucas Munhoz**, por todo amor, companheirismo e lealdade nesses anos juntos, sempre me apoiando e incentivando em todos os momentos. Por todos estes motivos e por inúmeros outros que eu dedico a vocês, não só mais esta conquista como todo meu amor e imensa gratidão por toda minha vida.*

# Agradecimentos

*Agradeço à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.*

*À disciplina de **Periodontia** e ao departamento de **Cirurgia e Clínica Integrada** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade do Estado de São Paulo - UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil.*

*À **Banca Examinadora**, Prof. Dr. Juliano Milanezi de Almeida, Prof. Adj. Celso Koogi Sonoda, e à Doutouranda Vivian Cristina Noronha Novaes, pela disponibilidade em avaliar o meu trabalho. Contribuindo imensamente para minha formação.*

*À **Prof.<sup>a</sup> Ass. Dr.<sup>a</sup> Suely Regina Mogami Bomfim** pela disponibilidade e dedicação e por ser fundamental na realização desta pesquisa.*

*Ao mestrando **Fabrizio Cabrera Pazmiño**, pela dedicação e execução de vários procedimentos na realização desta pesquisa.*

*À todos os professores, técnicos, assistentes e amigos que influenciaram de maneira direta na minha trajetória e contribuíram de forma inestimável para minha formação.*

# Agradecimentos Especiais

*Ao meu orientador Prof. Dr. **Juliano Milanezi de Almeida**, agradeço por ter me recebido e acolhido como orientada, por ter contribuído de forma imensurável para o meu aprendizado e formação. Por ser além de um orientador, ser um conselheiro, um amigo. Obrigada por toda paciência com meus “chororôs”, por todo tempo e dedicação que me disponibilizou e por ser um exemplo de professor, profissional e pessoa. Tenho grande admiração e gratidão por tudo que me proporcionou nesse tempo que trabalhamos juntos.*

*À minha “chefe” **Vivian Cristina Noronha Novaes**, por ter me ajudado em absolutamente todas as etapas do TCC, pela sua dedicação e paciência comigo, pela sua disponibilidade, nunca se negou em me ajudar, sempre se empenhando em fazer o melhor para meu aprendizado. Sou imensamente grata por todo seu carinho e dedicação e por apesar de tantos compromissos, dedicar grande parte do seu tempo para me ensinar. Um grande exemplo de profissional e uma grande amiga.*

*Ao Prof. Dr. **Álvaro Francisco Bosco**, por sua grande bondade e humanidade. Sou eternamente grata pelo seu gesto no qual negociou o fornecimento de todo material de periodontia e cirurgia com a empresa Golgran, que foi fundamental para dar continuidade ao meu curso com enorme motivação.*

*À minha grande amiga **Lúisa Salzedas**, que num dos momentos mais difíceis da minha vida, se motivou em me ajudar, procurando ajuda de todas as formas possíveis e junto com o professor Álvaro conseguiram a doação dos materiais odontológicos, obrigada pela amizade, companhia e lealdade de tantos anos*

*Ao Vice-Diretor Prof. **Wilson Roberto Poi**, por agir além das funções de um professor e vice diretor e se tornar um grande amigo, disposto a me ajudar durante toda minha graduação, nos momentos mais difíceis sempre encontrou uma maneira de me amparar.*

*Ao meu avô **Alberto Januario**, obrigada por sempre me apoiar, me incentivar, por todas as histórias que me conta e que alegra meus dias, por todas orações e agradeço por ser o avô coruja que eu tanto amo.*

*À empresa **Golgran**, pelo fornecimento dos instrumentais de cirurgia e periodontia, que foi de fundamental importância para a minha formação.*

*Aos meus sogros **Eva e Júnior Munhoz**, por me acolherem na família, pelo carinho e afeto que me dão, por me fazerem sentir como uma filha.*

*À minha amiga de todas as horas **Priscila Bronzato**, que desde o começo da nossa graduação nos identificamos e permanecemos com uma amizade verdadeira até hoje e que vou levar para a vida toda. Obrigada por todos os conselhos, ajudas, caronas, almoços e principalmente pela linda amizade.*

*Às minhas amigas **Adriele, Amanda, Ana Paula, Bárbara, Camila, Flávia, Natália Pollyanna, Tamires, Tamara** e todas outras que me apoiam e me incentivam cada uma a sua maneira, todas muito especiais e importantes na minha vida.*

*À todas as pessoas, amigos, conhecidos, familiares que estiveram comigo nesta caminhada, me apoiando, incentivando e desejando o meu melhor, e por todo esse apoio e admiração que eu me esforço para me tornar uma profissional de qualidade e poder retribuir a todos com meu trabalho e dedicação.*

# Epígrafe

*“Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer.”* **Mahatma Gandhi**

Araujo, NJ. **Avaliação da Fosfatase Alcalina em Ratos Alcoolizados Portadores de Periodontite Experimental**. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

### **Resumo**

O uso de marcadores dos processos metabólicos em curso no tecido ósseo, como a Fosfatase Alcalina (FA), podem elucidar questões relacionadas a influências sistêmicas sobre a doença periodontal. O presente estudo teve por objetivo avaliar os níveis séricos de FA em ratos alcoolizados portadores de Periodontite Experimental (PE). Para isso, 80 ratos (Wistar) machos foram divididos em dois grupos experimentais (n= 40), sendo Grupo NA: animais não alcoolizados, submetidos a administração de apenas água; Grupo A: animais alcoolizados submetidos a administração de solução alcoólica (36%). Após 30 dias do início das administrações, todos os animais de ambos os grupos foram submetidos a adaptação de um fio de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores para a indução da PE. A avaliação da FA sérica foi realizada pelo método cinético. Foram obtidas amostras sanguíneas por punção cardíaca previamente ao início da administração das soluções alcóolicas, no dia da indução da PE, e nos períodos de 3, 7, 15 e 30 dias após indução da PE. Os dados coletados foram submetidos à análise estatística (ANOVA, Teste Tukey;  $p \leq 0,05$ ). Na análise intragrupo, no Grupo NA houve queda nos níveis de FA aos 7 e 15 dias quando comparado ao -30 e 0 dias. No Grupo A houve queda em todos os períodos quando comparado ao -30 dias. Na análise intergrupo, o Grupo A apresentou menor nível de FA aos 30 dias quando comparado ao Grupo NA no mesmo período. Concluiu-se que o uso abusivo de álcool teve efeito negativo nos níveis séricos de FA em animais portadores de PE, podendo ser uma via responsável pela exacerbação da PE.

Palavras-chave: Fosfatase Alcalina. Doenças Periodontais. Alcoolismo. Ratos.



Araujo, NJ. Evaluation of Alkaline Phosphatase in intake-alcoholic rats with Experimental Periodontitis. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

### **Abstract**

The use of markers of metabolic processes taking place in the bone tissue, such as Alkaline Phosphatase (AP), may elucidate issues related to systemic influences on periodontal disease. The present study aimed to evaluate the serum levels of AP in intake-alcoholic rats with Experimental Periodontitis (EP). 80 rats (Wistar rats) were divided into two experimental groups (n = 40). Group NA: non-alcoholic rats; Group A intake-alcoholic rats with alcoholic solution (36% v/v). 30 days after the start of alcoholic solution, in all animals in both groups a cotton thread was placed around the first molars to induce EP. The AP evaluation of serum was carried out by a kinetic method. Blood samples were collected by cardiac puncture before the start of administration of alcoholic solutions, on the induction of EP, and the periods of 3, 7, 15 and 30 days after induction of EP. The data were subjected to statistical analysis (ANOVA, Tukey test,  $P \leq 0.05$ ). In the intragroup analysis, the Group NA showed decreased levels of AP at 7 and 15 days compared to -30 and 0 days. In Group A there was a decrease in all periods compared to -30 days. In the intergroup analysis, Group A showed lower levels of AP at 30 days when compared to NA Group in the same period. It was concluded that the abusive use of alcohol had a negative effect on serum levels of AP in rats with EP and may be responsible for the exacerbation of EP.

**Keywords:** Alkaline Phosphatase. Periodontal Diseases. Alcoholism. Rats.

# Lista de Figuras

|           |                                                    | Pág. |
|-----------|----------------------------------------------------|------|
| Figura 1  | Frascos de Xilazina (6mg/kg) e Quetamina (70mg/Kg) | 30   |
| Figura 2  | Solução alcóolica acondicionada em bebedouro       | 30   |
| Figura 3  | Indução da Periodontite Experimental               | 31   |
| Figura 4  | Punção cardíaca                                    | 31   |
| Figura 5  | Frasco com gel separador                           | 32   |
| Figura 6  | Centrífuga                                         | 32   |
| Figura 7  | Kit da Fosfatase Alcalina                          | 33   |
| Figura 8  | Espectrofotômetro                                  | 33   |
| Figura 9  | Gráfico - Fosfatase Alcalina                       | 34   |
| Figura 10 | Gráfico – Fosfatase Alcalina (desvio padrão)       | 35   |

# Lista de Abreviaturas e Siglas

°C – Graus Celsius

μL – microlitro

ANOVA - Análise de Variância

ATP – Adenosina Trifosfato

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

DP – Doença Periodontal

FA - Fosfatase Alcalina

Fig – Figura

g - grama

mg – miligrama

mg/Kg - miligramas por quilograma

min – minuto

ml – mililitro

nm – nanômetro

n° - número

OMS – Organização Mundial de Saúde

PE – Periodontite experimental

pH – potencial Hidrogênico

RPMs – Rotações por minuto

RT – Reagente de Trabalho

v/v – concentração em volume

# Sumário

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 1 Introdução .....                                             | 12 |
| 2 Materiais e Métodos .....                                    | 15 |
| 2.1 Animais.....                                               | 15 |
| 2.2 Sedação e Anestesia.....                                   | 15 |
| 2.3 Grupos Experimentais .....                                 | 15 |
| 2.4 Administração do Álcool.....                               | 16 |
| 2.5 Método de Indução da Periodontite Experimental (PE).....   | 16 |
| 2.6 Coleta Sanguínea e Períodos de Análise .....               | 16 |
| 2.7 Linha do Tempo .....                                       | 17 |
| 2.8 Obtenção do Soro e Análise da Fosfatase Alcalina (FA)..... | 17 |
| 2.9 Análise estatística dos resultados .....                   | 18 |
| 3 Resultados.....                                              | 19 |
| 3.1 Análise da Fosfatase Alcalina .....                        | 19 |
| 4 Discussão .....                                              | 20 |
| 5 Conclusão .....                                              | 24 |
| Referências Bibliográficas.....                                | 25 |
| Figuras .....                                                  | 30 |
| Anexo.....                                                     | 36 |

## 1 Introdução

A Doença Periodontal (DP) é uma doença multifatorial causada pela presença de bactérias e seus produtos, associada à resposta imuno-inflamatória do hospedeiro (PAGE; KORNAMAM, 1997). Estas bactérias podem causar danos diretamente ao periodonto e também indiretamente por ativar uma variedade de respostas imunológicas no hospedeiro que resultam em destruição dos tecidos periodontais (DEAS et al., 2003). A DP se caracteriza pela destruição da estrutura de suporte dos dentes, incluindo o ligamento periodontal, o osso alveolar e os tecidos gengivais (KINANE, 2001). Existem vários fatores que podem influenciar na progressão da DP, incluindo fatores individuais, comportamentais, sistêmicos, genéticos e a composição microbiana do biofilme dentário. Dentre os fatores comportamentais incluem o fumo, fator sócio econômico, nutricional, psicológico e consumo excessivo de álcool (NUNN, 2003).

O álcool é uma substância que vem sendo consumida, excessivamente, em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS – WHO, 2004) estima que 2 bilhões de pessoas consumam bebidas alcoólicas. No Brasil, este consumo é de 8,6 litros per capita entre os anos de 1961 – 2000. O consumo de bebida alcoólica no Brasil cresceu 154,8% per capita, colocando o Brasil entre os 25 países que mais consomem bebida alcoólica (WHO, 2004). O alcoolismo é uma doença crônica com evolução lenta, levando em média de 15 a 20 anos para apresentar evidências clínicas. É considerado pela OMS a terceira causa de morte no mundo, estando atrás do câncer e doenças cardiovasculares, tornando-se, desta forma, um problema de Saúde Pública (WHO, 1992). O impacto do consumo excessivo de álcool no sistema imunológico e o aumento da predisposição à ocorrência de diversas infecções tem sido apontado na literatura (DURYEE et al., 2007; SALERNO et al., 2001; SZABO, 1999). O consumo abusivo de álcool está associado à redução na resposta do hospedeiro em relação a suas defesas antimicrobianas, imunidade antiviral e reparo a traumas ou injúrias (SZABO, 1999). Além das fortes evidências de que a ingestão de álcool pode causar sérios danos à saúde geral, estudos têm sugerido que o consumo de álcool pode contribuir também para efeitos nocivos na cavidade oral, como cáries, perda de dentes, câncer de orofaringe e o desenvolvimento da DP. (ENBERG et al., 2001; HARRIS et al., 1996; LARATO DC, 1972).

A literatura tem ressaltado a importância de se avaliar os efeitos adversos do álcool sobre o periodonto (CLARKE; HIRSCH, 1995; HEITZ-MAYFIELD et al., 2005; STANFORD; REES, 2003). Estudos clínicos (AMARAL et al., 2008; AMARAL et al., 2011;

LAITINEN et al., 1991; TEZAL et al., 2001; TOMOFUJI et al., 2008) e em animais (DANTAS et al., 2012; MIJARES et al., 2012; TORRUNG et al., 2005) relatam uma íntima associação entre o consumo abusivo de álcool e DP, comprovando que esta relação tem um efeito negativo nos tecidos periodontais. Por outro lado, outros estudos (SURKIN et al. 2014; SZABO et al., 1999), demonstram uma associação limitada ou mesmo inexistente entre DP e consumo de álcool. O mecanismo exato pelo qual o consumo abusivo de álcool afeta os tecidos periodontais não está totalmente elucidado. Entretanto, há princípios biológicos que podem explicar que o álcool pode influenciar a resposta do hospedeiro por prejuízo aos neutrófilos, macrófagos e função das células T, bem como aumento da frequência de infecções (CHRISTEN et al., 1983), além de possuir efeito tóxico sobre o fígado e interferir com o metabolismo proteico (TAUBMAN et al., 2007).

A atividade do tecido ósseo de formação e reabsorção pode ser avaliada por meio de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo. Tais marcadores são empregados na prática clínica há muitas décadas, em especial o estudo da Fosfatase Alcalina (FA) (VIEIRA, 1999). A FA é uma enzima hidrolase que pode hidrolisar a ligação éster do composto de fosfato orgânico em condições alcalinas e desempenha um importante papel na calcificação dos ossos. A enzima hidrolisa não só as substâncias que inibem a calcificação, tais como pirofosfato e o ATP, mas também é indispensável para a produção do aumento da concentração de fosfato necessário para a cristalização de hidroxiapatita (ANDERSON, 1989). Além disso, a elevada atividade da FA correlaciona com a formação de matriz em osteoblastos, antes do início da mineralização (GERSTENFELD et al., 1987). A FA também é um importante indicador da formação óssea e um marcador fenotípico para osteoblastos. No tecido ósseo a FA exerce provavelmente um papel na deposição de fosfato de cálcio, pois esta enzima frequentemente apresenta-se elevada em muitos distúrbios ósseos, incluindo doença de Paget e osteomalácia (ROSKOSKI JR, 1997), onde os níveis da FA podem ser diagnosticados através de exames sanguíneos (SILVERTHORN, 2010).

Em razão da FA funcionar como um marcador da atividade óssea, uma correlação entre as variações nos níveis de FA e a influência do consumo crônico de álcool na regulação óssea pode ser sugerida. Além disso, diversos estudos têm demonstrado a relação entre a variação nos níveis de FA e a DP (CHAPLLE et al., 1999; GILBERT et al., 2003; GOES et al., 2012; NASSAR et al., 2008; TOTAN et al., 2006). Seu nível está correlacionado com a severidade da DP e tem a particularidade de estar envolvida na inflamação e no processo de regeneração, as mudanças nos níveis são devidas as alterações nos tecidos, como um resultado da relação

hospedeiro-parasita ou interação hospedeiro-bactéria (SANIKOP et al, 2012). Do mesmo modo, outros estudos que utilizaram animais alcoolizados a variação nos níveis de FA também foi observada (BROULIK et al., 2010; CALLACI et al., 2009; CUI et al., 2006). Em estudo clínico, Tezal et al. (2001), demonstraram que o consumo abusivo de álcool pode levar a diminuição nos níveis de FA no soro e estimular a reabsorção óssea. Porém, os dados que correlacionem as variações dos níveis de FA e a influência do consumo crônico de álcool na DP são escassos.

Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar a influência do alcoolismo nos níveis séricos de FA em animais portadores de periodontite experimental (PE).

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Animais

No presente estudo foram utilizados 80 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar) machos, pesando aproximadamente 260g, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP – Araçatuba. Os animais apresentaram-se saudáveis e em condições de se submeterem aos procedimentos experimentais. Estes animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo cinco animais cada, separados de acordo com o grupo experimental e, alimentados com ração e água *ad libitum*. Todos os protocolos descritos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, (processo nº FOA-00636-2013) (Anexo A). A pesquisa foi realizada seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a legislação em vigor.

### 2.2 Sedação e Anestesia

Para indução da PE, inicialmente os animais foram pesados para proporcionar corretamente a dose do anestésico a ser administrado. Os animais receberam anestesia geral, obtida pela associação de 70 mg/kg de Cloridrato de quetamina (Vetaset – Fort Dodge Iowa – USA) e 6 mg/kg de Cloridrato de xilazina (Coopazine – Coopers São Paulo – Brasil) (Fig.1), aplicados intramuscular no *biceps femoris* da pata direita. Nos casos em que não se obteve o necessário efeito do anestésico, a anestesia foi suplementada com a metade da dose inicial aplicada.

### 2.3 Grupos Experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em 2 (dois) grupos experimentais. Os grupos foram definidos de acordo com os seguintes tratamentos:

**Grupo NA** = 40 ratos não alcoolizados

**Grupo A** = 40 ratos alcoolizados



Após 30 dias do início da administração do álcool nos animais do Grupo A, todos os animais de ambos os grupos foram submetidos a indução da Periodontite Experimental (PE).

## **2.4 Administração do Álcool**

Os animais do Grupo A receberam solução alcoólica na concentração de 36% v/v seguindo a metodologia de D'Souza et al., 2010 e alimento *ad libitum*. O início da administração da solução alcoólica foi realizado 30 dias antes da indução da PE, permanecendo até o final do experimento (Fig.2).

## **2.5 Método de Indução da Periodontite Experimental (PE)**

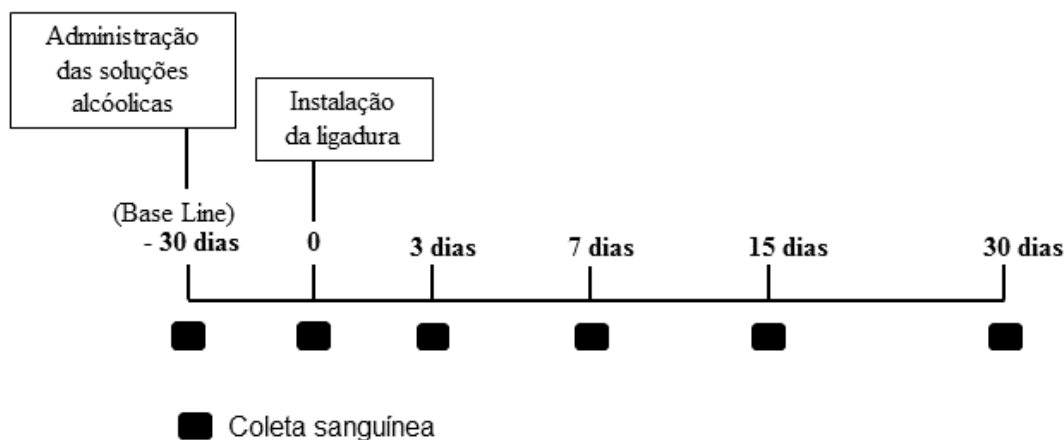
Após anestesia geral, todos os animais foram posicionados em mesa operatória apropriada, a qual permitiu a manutenção da abertura bucal dos ratos facilitando o acesso aos dentes da região posterior da mandíbula. Com o auxílio de uma sonda e pinça modificada, foi adaptado um fio de algodão número 24 (Corrente Algodão nº 24; Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores, distribuído randomicamente entre o lado direito e esquerdo, ao nível do sulco gengival, e mantidos por meio de nós cirúrgicos (Fig. 3). Esta ligadura atuou como irritante gengival favorecendo o acúmulo de placa bacteriana (Johnson, 1975).

## **2.6 Coleta Sanguínea e Períodos de Análise**

Foram coletados 3 ml de sangue por punção cardíaca (Fig. 4) de todos os animais nos momentos -30 dias (Baseline), 0 dias (imediatamente antes da indução da PE) e em 10 animais de cada grupo aos 3, 7, 15 e 30 dias após indução da PE.

Após as coletas sanguíneas de 3, 7, 15 e 30 dias, os animais foram eutanasiados em cada período por meio de dose letal de anestésico (Thiopental 150 mg/kg).

## 2.7 Linha do Tempo



## 2.8 Obtenção do Soro e Análise da Fosfatase Alcalina (FA)

Após a coleta sanguínea, as amostras contendo 3 ml de sangue foram colocadas em tubos contendo gel de separação (Fig. 5) e permaneceram em repouso por um período de 20 min. Após esse período as amostras foram centrifugadas (Centribio-TDLS0-2B, Diadema, SP, Brasil) (Fig. 6) com 3000 RPMs por 10 minutos para obtenção do soro.

O soro obtido foi aliquoteado em 2 tubos e congelado em  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise. O volume de 20  $\mu\text{L}$  foi utilizado para determinação da FA.

A determinação da FA sérica foi realizada pelo método cinético de acordo com as recomendações do fabricante (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, MG, Brasil) (Fig. 7) e analisados em espectrofotômetro semi-automatizado (SB-190 Celm, Barueri, SP, Brasil) (Fig. 8).

Em pH alcalino, a FA do soro, hidrolisa o p-nitrofenilfosfato liberando o p-nitrofenol e fosfato inorgânico. A quantidade produzida de p-nitrofenol que tem elevada absorbância em 405nm é diretamente proporcional à atividade enzimática da FA na amostra de acordo com a metodologia modificada de McComb et al., 1981.

Em seguida foi realizado o preparo do Reagente de Trabalho (RT) utilizando os dois reagentes distribuídos adequadamente no kit de FA (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, MG, Brasil). Para o preparo do RT o conteúdo do frasco do reagente 2 foi transferido para um frasco do reagente 1 e homogeneizado por inversão. O RT é estável por 30 dias em temperatura entre  $2 - 8^{\circ}\text{C}$ . O preparo do RT no momento da utilização confere maior estabilidade na forma líquida original

e manutenção das condições ótimas da reação, permitindo a utilização direta dos reagentes em sistemas automáticos.

Após o preparo do RT, em um tubo Teste foi pipetado 1,0ml do RT. Em seguida foi adicionando 0,02 ml da amostra, homogeneizado e transferido imediatamente para a cubeta termostática a  $37 \pm 0,2$  °C, aguardando 1 min. Após os referidos procedimentos o aparelho de espectrofotômetro semi-automático (SB-190 Celm, Barueri, SP, Brasil) realizou a leitura dos resultados da FA.

## **2.9 Análise estatística dos resultados**

A hipótese de não haver diferença estatisticamente significativa nos níveis de FA entre os diferentes grupos e períodos foi testada (Bioestat 5.0, Windows XP, Sonopress Brazilian Industry, Manaus, AM, Brasil). Após análise da normalidade dos dados pelo teste Shapiro-Wilk ( $p \leq 0,05$ ), a análise intragrupo e intergrupo foi realizada pela análise de variância a dois critérios (ANOVA  $p \leq 0,05$ ). Quando o ANOVA detectou diferença estatística as comparações múltiplas foram realizadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### **3 Resultados**

#### **3.1 Análise da Fosfatase Alcalina**

Os resultados estão apresentados nas figuras 9 e 10. Na análise intragrupo, ao compararmos os diferentes períodos, observou-se que o Grupo NA apresentou queda nos níveis de FA com diferença estatisticamente significativa aos 7 e 15 dias ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao Base Line e 0 dias. O Grupo A apresentou queda nos níveis de FA com diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) aos 0, 3, 7, 15 e 30 dias quando comparado ao Base Line (Fig. 9).

Na análise intergrupos foi observado que o Grupo A apresentou menor nível de FA aos 30 dias após a indução da PE, com diferença estatisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) quando comparado ao Grupo NA no mesmo período (Fig. 10).

## 4. Discussão

Na periodontia moderna, a identificação de fatores modificadores na resposta do hospedeiro é fundamental no sucesso da terapêutica periodontal. Com relação a DP e o consumo abusivo de álcool, estudos (AMARAL et al., 2008; TOMOFUJI et al., 2008) revelam que as destruições periodontais observadas em pacientes que fazem uso abusivo de álcool são independentes do índice de placa, uma vez que os pacientes alcóolicos apresentavam índices de placa semelhante aos não alcóolicos. Além disso, evidências científicas (CHAVASSIEUX et al., 1993; D'SOUZA et al., 2010; MARCHINI et al., 2012) comprovam que os prejuízos ósseos são decorrentes de alterações sistêmicas provocadas pelo consumo abusivo de álcool sendo estes dose dependentes.

O uso de metodologias que possam quantificar substâncias que podem representar os processos metabólicos em curso no tecido ósseo, decorrentes de fenômenos fisiológicos ou patológicos, podem elucidar questões relacionadas a influência sistêmica sobre a DP. Podemos definir os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo como substâncias que retratam a formação ou a reabsorção óssea, sendo a FA um marcador do processo de formação óssea e fruto da síntese dos osteoblastos (VIEIRA, 1999). Dentro destes princípios diversos estudos relataram alterações nos níveis de FA relacionados a DP (GILBERT et al., 2003; JÚNIOR, 2006; KELES et al., 2005) e também ao consumo abusivo de álcool (BROULIK et al., 2010; CALLACI et al., 2009; CUI et al., 2006)

No presente estudo foi utilizado um modelo animal para reprodução da associação do consumo abusivo de álcool e DP. Modelos animais são necessários para provar a relação de causa/efeito e testar o potencial terapêutico de novas tecnologias. O modelo de indução do alcoolismo adotado no presente estudo foi pelo livre acesso dos animais à solução alcóolica na concentração de 36% (v/v) (COLEMAN et al., 2008). Este modelo apresenta como vantagem de ser um método prático para longos períodos de exposição ao álcool, fisiológico e promover um quadro de alcoolismo semelhante ao observado em humanos (D'SOUZA et al., 2010). Adicionalmente, Klausen et al. (1989) afirmaram que a estrutura periodontal do homem é semelhante à estrutura dos ratos, razão pela qual esses animais são adequados a pesquisas envolvendo questões periodontais. Page & Schroeder (1982) referiram-se à periodontite em ratos, considerando que sua estrutura oral e fisiológica, bem como a patogênese das doenças periodontais, é mais semelhante à do ser humano do que a de outros roedores e/ou animais.

Desta maneira, no presente estudo, ao compararmos os diferentes períodos no mesmo grupo, observou-se que o Grupo NA apresentou queda nos níveis de FA com diferença estatística significativa nos períodos de 7 e 15 dias quando comparado aos períodos Base Line e 0 dias (Indução da PE). Este resultado está de acordo com o apresentado por Goes et al., (2012) que avaliou a FA em animais após a indução da DP, verificando queda nos níveis de FA, intensa perda óssea alveolar e destruição do ligamento periodontal. O mesmo foi observado no estudo de Nassar et al., (2008) que também observaram a queda nos níveis de FA nos animais com DP induzida quando comparado aos animais saudáveis sem DP. Estudo em humanos também mostrou o mesmo resultado, como o apresentado por Gilbert et al. (2003), que ao avaliar a dosagem de FA óssea no soro de pacientes com DP, observaram que esta foi menor quando comparada com a dosagem de pacientes saudáveis.

Por outro lado, diversos estudos demonstraram um aumento nos níveis de FA associado a DP, confrontando os resultados observados no presente estudo. Isso pode ser explicado em razão de que quando a DP se torna crônica, os níveis de FA podem se tornar elevados, como apresentado no estudo de Amaral, (2013), no qual observou que a Fosfatase alcalina é uma enzima presente principalmente nas fases finais da cicatrização periodontal, portanto não se espera encontrar a sua atividade acentuada durante as fases iniciais da doença periodontal. Da mesma forma, Slovik et al., (1984) ao avaliarem a remodelação óssea por meio de medições de osteocalcina no soro sanguíneo em pacientes hospitalizados, observaram elevados níveis de FA associado ao processo de renovação óssea. Auxiliar a esses estudos, Júnior, (2006) demonstrou que a atividade da FA foi maior em indivíduos com periodontite crônica quando comparada com indivíduos saudáveis. A atividade da FA aumenta em pH básico e na presença de cálcio, o qual atua como cofator da enzima. Portanto, o pH alcalino e a alta concentração de cálcio em pacientes com doença periodontal crônica podem contribuir para o aumento da atividade dessa enzima (CHAPLLE et al., 1999; TOTAN et al., 2006).

Ainda na análise intragrupo, com relação ao Grupo A do nosso estudo, este apresentou queda nos níveis de FA com diferença estatística significativa no período de 0 dias, quando comparados ao Base Line, o que representa uma diminuição da atividade da FA relacionada apenas ao consumo abusivo do álcool. Este resultado está de acordo com Cui et al., (2006), que estudou o efeito do álcool sobre a diferenciação de células troncos da medula óssea de rato e foi verificado uma diminuição do nível de FA, nos animais que receberam concentrações crescentes de etanol. Colaborando também para nosso resultado, Callaci et al. (2009) verificaram em um estudo experimental em modelo animal, diversas alterações relacionadas ao

metabolismo ósseo decorrentes da exposição crônica do álcool, entre elas a redução da atividade da FA e diminuição significativa na expressão de reguladores da ativação osteoblástica, assim como de proteínas morfogenéticas, concluindo que o alcoolismo perturba a expressão de genes responsáveis pela remodelação óssea e consequentemente, promove a perda da homeostase, podendo levar a uma perda da integridade óssea.

No presente estudo, ao realizamos a análise intergrupos, o Grupo A apresentou menor nível de FA aos 30 dias após a indução da PE, com diferença estatisticamente significante quando comparado ao Grupo NA no mesmo período. Como apresentado anteriormente, a queda nos níveis de FA, foi observada em diversos estudos experimentais tanto após a indução da DP (GOES et al., 2012; NASSAR et al., 2008), como após o uso abusivo de álcool (CUI et al., 2006; CALLACI et al. 2009). Portanto, diante dos nossos resultados, podemos inferir que o uso abusivo de álcool associado a DP poderia retardar o processo de cronificação da PE, o que iria influenciar na progressão da PE. Khocht et al., (2003) em estudo clínico também sugeriram que o abuso de álcool, agrava a doença periodontal. Broulik et al. (2010), verificaram que além da diminuição da FA nos grupos de animais tratados cronicamente com etanol, também foi observada a diminuição de 12% da resistência mecânica óssea e redução de 10% da densidade mineral óssea, além de decréscimo da espessura cortical óssea, quando comparado ao grupo controle. Neste mesmo estudo os níveis de cálcio e fósforo também se apresentaram diminuídos. No estudo de Tezal et al. (2001), foi demonstrado que o álcool além de levar a diminuição nos níveis de FA no soro, também pode estimular a reabsorção óssea, e apresentar um efeito tóxico direto sobre os tecidos periodontais. Estes resultados estão de acordo com estudo de Souza et al. (2011), que observou uma relação entre o consumo de altas doses de álcool e a redução do suporte ósseo periodontal na PE.

Desta forma, a literatura tem ressaltado a importância de se avaliar a relação entre o álcool e a DP. Sendo assim, a identificação dos fatores modificadores, como os fatores comportamentais na resposta do hospedeiro com relação ao consumo abusivo de álcool é de fundamental importância na terapêutica periodontal. Como apresentado em diversos estudos encontrados na literatura, o uso abusivo de álcool tem demonstrado influência negativa na DP (TEZAL et al. 2001; KHOCHT et al., 2003; DE SOUZA et al., 2011), o que pode estar relacionado com resultados encontrados no presente estudo. Sendo a FA um importante indicador da formação óssea e um marcador fenotípico para osteoblastos, pode se sugerir uma correlação entre as variações nos níveis de FA e a influência do consumo crônico de álcool na

regulação óssea. As variações dos níveis de FA são de fundamental importância para avaliar as alterações e a severidade da DP.



## **5 Conclusão**

Assim, dentro dos limites do presente estudo pode se concluir que o uso abusivo de álcool tem efeito negativo nos níveis séricos de FA, podendo ser uma das vias responsáveis pela exacerbação da DP.

## **Agradecimentos**

À Disciplina de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araçatuba, São Paulo, Brasil. À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista -UNESP, Araçatuba, São Paulo. Ao auxílio à pesquisa Primeiros Projetos FUNDUNESP, Edital 0096/004/13 PROPE/CDC.

# Referências Bibliográficas

- AMARAL, C. C. F. **Estudo do fenótipo osteoblástico em células-tronco mesenquimais de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos na presença ou não de doença periodontal**, 2013. 150 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Faculdade de Odontologia de Araçatuba.
- AMARAL, S.; DA SILVA-BOGHOSSIAN, C.M.; LEÃO, A.T.; COLOMBO, A.P. Evaluation of the subgingival microbiota of alcoholic and non-alcoholic individuals. **J. Dent.**, v.39, n.11, p.729-738, 2011.
- AMARAL, S.; LUIZ, R.R.; LEÃO, A.T. The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. **J Periodontol**, v.79, n.6, p.993-998. 2008.
- ANDERSON, H.C. Mechanism of mineral formation in bone. **Lab Invest.**, v.60, n.3, p.320-30. 1989.
- BROULÍK, P. D. et al. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. **Physiol. Res.**, v. 59, n. 4, p. 599-604, 2010.
- CALLACI, J. J. et al. Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. **Calcif. tissue int.**, v. 84, n. 6, p. 474-484, 2009.
- CHAPPLE, I. L. et al. Prediction and diagnosis of attachment loss by enhanced chemiluminescent assay of crevicular fluid alkaline phosphatase levels. **J. Clin. Periodontol.**, Boston, v. 26, n. 3, p. 190-198, Mar. 1999.
- CHAVASSIEUX, P; SERRE, C.M; VERGNAUD, P; DELMAS, P.D; MEUNIER, P.J. In vitro evaluation of dose-effects of ethanol on human osteoblastic cells. **Bone Miner.**, v.22, p.95-103. 1993.
- CHRISTEN, A.G. Dentistry and the alcoholic patient. **Dent Clin North Am.**, v.27, n.2, p.341-361. 1983.
- CLARKE, N.G; HIRSCH, R.S. Personal risk factors for generalized periodontitis. **J Clin Periodontol.**, v.22, n.2, p.136-145. 1995.

- COLEMAN, R; YOUNG, B.M; TURNER, L.E; COOK, R.T. A practical method of chronic ethanol administration in mice. **Methods Mol Biol.**, v.447, p.49-59, 2008.
- CUI, Q; WANG, Y; SALEH, K.J; WANG, G.J; BALIAN, G. Alcohol-induced adipogenesis in a cloned bone-marrow stem cell. **J Bone Joint Surg Am.**, 2006;88 Suppl 3, p.148-154.
- DANTAS, A.M. et al. Ethanol consumption enhances periodontal inflammatory markers in rats. **Arch Oral Biol.**, v.57, n.9, p.1211-1217. 2012.
- DE SOUZA D. M; DA ROCHA R. F. Associação entre ingestão de álcool e periodontite experimental em ratas fêmeas, 2011. **Revista da AMRIGS**, v.55, n.4, p.315-319, 2011.
- DEAS, D.E; MACKEY, S.A; MCDONNELL, H.T; Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. **Periodontol 2000**, v.32, p.82-104. 2003.
- D'SOUZA EL-GUINDY, N.B. et al. Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.34, p.1489-1511. 2010.
- DURYEE, M.J; KLASSEN, L.; THIELE, G.M. Immunological response in alcoholic liver disease. **World J Gastroenterol.**, v.13, n.37, p.4938-4946. 2007.
- ENBERG N. et al. Dental diseases and loss of teeth in a group of Finnish alcoholics: a radiological study. **Acta Odontol Scand.**, v.59, n.6 p.341-347. 2001.
- GERSTENFELD, L.C; CHIPMAN, S.D; GLOWACKI, J; LIAN, J.B. Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. **Dev Biol.**, v.122, n.1, p.49-60. 1987.
- GILBERT, P; TRAMINI, P; SIESO, V; PIVA, M. T. Alkaline phosphatase isoenzyme activity in serum from patients with chronic periodontitis. **J. Periodont.**, v.38, p.362-365, 2003.
- GOES P; MELO I.M; DUTRA C.S; LIMA A.P; LIMA V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. **Arch Oral Biol.**, v.57, n.11; p.1537-1544, 2012.
- GOES, P; MELO, I.M; DUTRA, C.S; LIMA, A.P; LIMA, V. Effect of alendronate on bone-specific alkaline phosphatase on periodontal bone loss in rats. **Arch Oral Biol.**, 2012, v.57, n.11, p.1537-1544.

- HARRIS, C.K. et al. Oral health in alcohol misusers. **Community Dent Health.**, v.13, n.4, p.199-203. 1996.
- HEITZ-MAYFIELD, L.J. Disease progression: identification of high-risk groups and individuals for periodontitis. **J Clin Periodontol.**, v.32, n.6, p.196-209. 2005.
- JOHNSON, J.H. Effects of local irritation and dextran and sulphat administration on the periodontium of the rat. **J Periodont Res.**, 1975, v.10, p.332-345.
- JUNIOR, A. A. B. **Avaliação de parâmetros salivares em pacientes portadores de doença periodontal**, 2006. 73 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia da Universidade de Taubaté.
- KELES, G. C. et al. Determination of systemically & locally induced periodontal defects in rats. **Indian J. Med. Res.**, v. 121, p. 176-184, 2005.
- KHOCHT, A. et al. The influence of gingival margin recession on loss of clinical attachment in alcohol-dependent patients without medical disorders. **J Periodontol.**, v.74, p.485-493. 2003.
- KINANE, D.F. Causation and pathogenesis of periodontal disease. **Periodontol 2000**, v.25, p.8-20. 2001.
- KLAUSEN, B; EVANS, R.T; SFINTESCU, C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level in rats. **Scand J Dent Res.**, v.97: p.494-499. 1989.
- LAITINEN, K; VÄLIMÄKI, M. Alcohol and bone. **Calcif Tissue Int.**, v.49 Suppl:S70-3. 1991.
- LARATO, D.C. Oral tissue changes in the chronic alcoholic. **J Periodontol.**, v.43, n.12, p.772-773. 1972.
- MARCHINI, A.M. et al. Influence of chronic alcoholism and oestrogen deficiency on the variation of stoichiometry of hydroxyapatite within alveolar bone crest of rats. **Arch Oral Biol.** v.57, p.1385-1394. 2012.
- MCCOMB, R.B; BOWERS, G.N; UPRETTI, A. **Clin Chem.**, v.27, p.135-141. 1981.
- MIJARES, D. et al. Oral bone loss induced by mineral deficiency in a rat model: effect of a synthetic bone mineral (SBM) preparation. **Arch Oral Biol.**, v.57 n.9 p.1264-1273. 2012.
- NASSAR P.O. et al. Simvastatin therapy in cyclosporine A-induced alveolar bone loss in rats. **J Periodont.**, v.44, p.479–488, 2009.

NUNN, M.E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. **Periodontol** 2000, v.32, p.11-23. 2003.

OMS – WHO. **Estratégia Global em Alimentação Saudável, Atividade Física e Saúde**. 2004. Disponível em: <<http://www.scribd.com/doc/2350390/Estrategia-Global-em-Alimentacao-Saudavel-Atividade-Fisica-e-Saude-OMS-2004>>. Acesso em: 6 jun. 2014.

PAGE, R.C; KORNMAN, K.S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol** 2000. v.14, p.9-11, 1997.

PAGE, R.C; SCHROEDER, H.E. Periodontitis in man and others animals. A comparative review. New York: **National Library**.1982.

ROBERTO ROSKOSKI, Jr., **Biochemistry**. Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, p. 60. 2010.

SALERNO, J.A; WALTENBAUGH, C; CIANCOTTO, N.P. Ethanol consumption and the susceptibility of mice to *Listeria monocytogenes* infection. **Alcohol Clin Exp Res.**, v.25, n.3, p.464-472. 2001.

SANIKOP S; PATIL S; AGRAWAL P. Gingival crevicular fluid alkaline phosphatase as a potential diagnostic marker of periodontal disease. **J Indian Soc Periodontol.**, v.16, n.4; p.513-518. 2012.

SILVERTHORN; DEE UNGLAUB, **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 5. ed. Artmed: Porto Alegre, p.100-101, 2010.

SLOVIK, R. M; GUNDBERG, C. M; NEER, R. M; LIAN, J. B. Clinical evaluation of bone turnover by serum osteocalcin measure- ments. **J. Clin. Invest.**, v.59, p.228-230. 1984.

STANFORD, T.W; REES, T.D. Acquired immune suppression and other risk factors/indicators for periodontal disease progression. **Periodontol** 2000. v.32, p.118-135. 2003.

SURKIN P.N. et al. Chronic alcohol consumption alters periodontal health in rats. **Alcohol Clin Exp Res.**, 2014. v.38, n.7, p.2001-2007.

SZABO, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. **Alcohol Alcohol**, v.34, n.6, p.830-841. 1999.

TAUBMAN, M.A; KAWAI, T; HAN, X. The new concept of periodontal disease pathogenesis requires new and novel therapeutic strategies. **J Clin Periodontol**. v.34, n.5, p.367-369. 2007.

TEZAL, M; GROSSI, S. G HOA. W. & GENCO, R.J. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v.72, p.183–189. 2001.

TOMOFUJI, T. et al. Oxidative damage of rat liver induced by ligature-induced periodontitis and chronic ethanol consumption. **Arch Oral Biol.**, v.53 n.12 p.1113-1118. 2008.

TORRUNGRUANG, K. et al. Risk indicators of periodontal disease in older Thai adults. **J Periodontol.**, v.76, n.4, p.558-565. 2005.

TOTAN, A. et al. Salivary aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase and alkaline phosphatase: possible markers in periodontal diseases? **Clin. Chem. Lab. Med.**, v. 44, n. 5, p. 612-615. 2006.

VIEIRA, J.G.H. Considerações Sobre os Marcadores Bioquímicos do Metabolismo Ósseo e sua Utilidade Prática. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.43, n.6, p. 416-422, 1999.

WHO. The classification of mental and behavioral disorders. Clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva: **World Health Organizatio**. 1992.

## Figuras



Fig 1. Frascos de Xilazina (6mg/Kg) e Quetamina (70 mg/Kg).



Fig 2. Solução Alcoólica Acondicionada em Bebedouro



Fig 3. Indução da Periodontite Experimental



Fig 4. Punção Cardíaca





Fig 5. Frasco com gel separador



Fig 6. Centrífuga



Fig 7. Kit da Fosfatase Alcalina



Fig 8. Espectrofotômetro

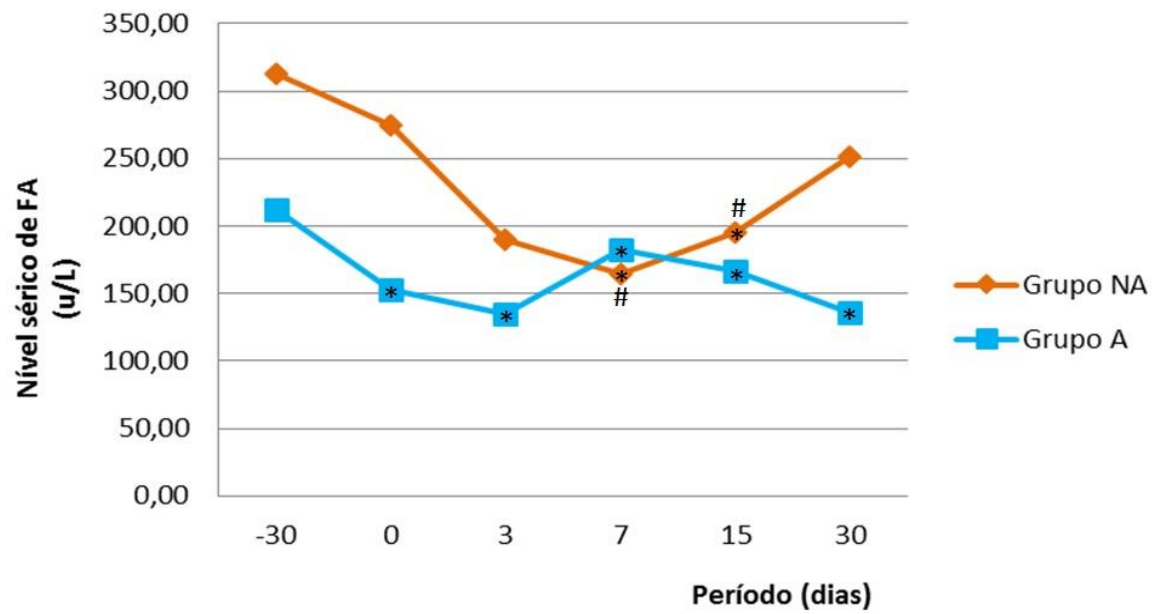


Fig 9. Figura representativa da variação dos níveis de FA em função dos períodos.

(\*) Diferença estatisticamente significativa com Baseline.

(#) Diferença estatisticamente significativa com o dia 0.

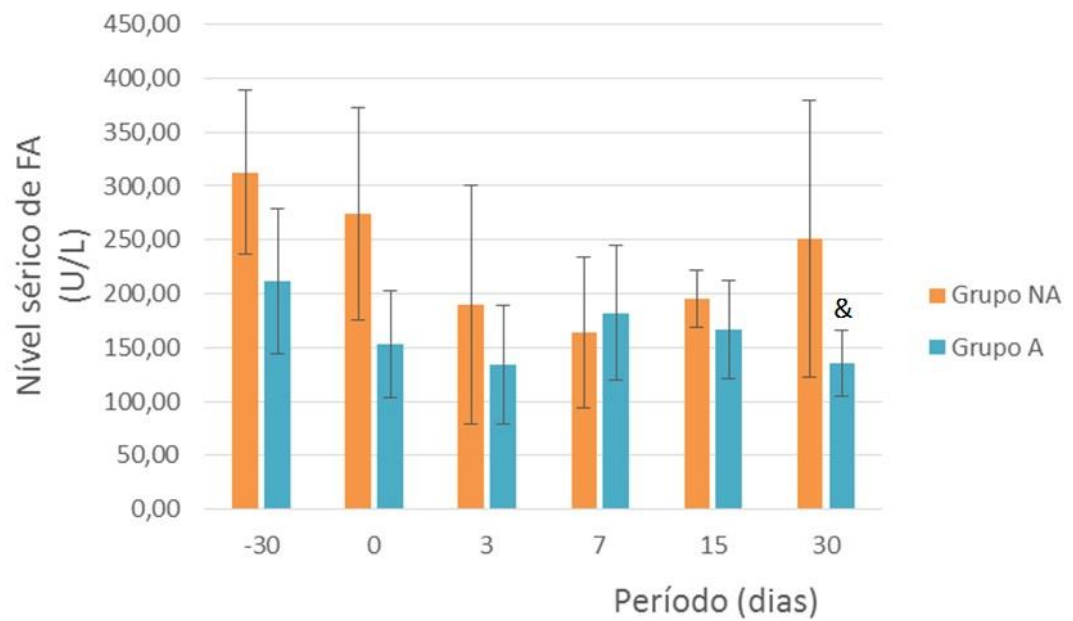


Fig 10. Figura representativa de Média e Desvio Padrão dos Níveis de FA nos diferentes grupos. ANOVA seguido pelo pós teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

(&) Diferença estatisticamente significativa com o Grupo NA no mesmo período.

## Anexo A – Certificado da Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)  
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Influência do consumo crônico de diferentes concentrações de álcool nos tecidos periodontais e na evolução da periodontite experimental" sob responsabilidade do Pesquisador **JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA** e colaboração de Victor Fabrizio Cabrera Pazmino, Vivian Cristina Noronha Novaes, Luiz Henrique Ferreira dos Santos Bonfietti, Paula Lazilha Falerios, Edilson Ervolino, Leticia Helena Theodoro e Valdir Gouveia Garcia está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **FOA-00636-2013**.

### CERTIFICATE

We certify that the research "Influence of chronic consumption of different concentrations of alcohol in the periodontal tissue and evolution of experimental periodontitis", process number **FOA-00636-2013**, under responsibility of **JULIANO MILANEZI DE ALMEIDA** and with collaboration of Victor Fabrizio Cabrera Pazmino, Vivian Cristina Noronha Novaes, Luiz Henrique Ferreira dos Santos Bonfietti, Paula Lazilha Falerios, Edilson Ervolino, Leticia Helena Theodoro and Valdir Gouveia Garcia agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

**Prof. Dra. MARY MARCONDES**  
Vice-Coordenadora da CEUA