



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

DOANY CEVADA DOS SANTOS

**Avaliação local do consumo profilático de vinho tinto sem
álcool no desenvolvimento da periodontite apical induzida
em ratos**

ARAÇATUBA - SP
2024

DOANY CEVADA DOS SANTOS

**Avaliação local do consumo profilático de vinho tinto sem
álcool no desenvolvimento da periodontite apical induzida
em ratos**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Odontologia
de Araçatuba da Universidade Estadual
Paulista (UNESP), como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Cirurgião-Dentista.

Orientador: Prof. Tit. João Eduardo
Gomes Filho

ARAÇATUBA - SP
2024

Primeiramente a Deus, que em todo o momento me sustentou, foi meu amigo e ajudador; também a minha família que proporcionou todos os meios, as condições, o apoio e amor para que esta etapa fosse concluída; aos meus amigos e familiares, que tornaram o trajeto mais feliz e leve.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de Araçatuba Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem e do vice-diretor Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra.

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2023/03085-9.

A *Deus*, que traçou todos os meus caminhos e me trouxe a esse lugar. Durante toda a graduação foi o meu sustento, guardando-me em todos os momentos. Sempre fui acompanhada de seus anjos pois, quando nem mesmo meus pais sabiam de minhas aflições, Deus enviava um anjo seu ou um sinal, mostrando que estava comigo.

Aos meus pais, *Andreia e Edvaldo*, que sempre me apoiaram e tornaram tudo possível. Foram zelosos durante esses anos, nunca me deixaram sozinha nem desamparada. À minha mãe pelo testemunho de fé e por me ensinar tudo o que sou e o que sei, ao meu pai pelo bom testemunho de temor a Deus e vida digna e fiel na terra. Ambos me ensinaram o respeito pela vida e pelos outros, a importância dos estudos, mas, sobretudo, a importância de ter um andar cristão e testemunho verdadeiro na terra e, por onde passar, não levar tristeza ou desentendimento, mas caridade, amor e temperança.

Ao meu irmão, *Gustavo*, que dividiu parte dos anos em Araçatuba comigo. Crescemos e amadurecemos juntos nesses anos e ele passou a ser mais que um irmão pra mim, um amigo. Parentesco não escolhemos, mas as amizades sim.

Aos meus avós: *Alice, José, Maria e Almerindo*; que são meus dengos, meus amores, minha vida. Sempre cuidaram de mim, mesmo de longe. Suas orações me sustentam e guardam em todo o tempo. Desejo ainda conseguir retribuir, nem que 1 %, de tudo que fizeram por mim.

Às minhas amigas e grupinho inseparável da graduação: *Carretinho, Minowa e Tabatinha*; que me divertiram todos os dias. Sem vocês eu teria ficado pelo caminho. Que bom ter atraído pessoas tão boas e desajustadas. Amo vocês e cada momento nosso, vou levá-las sempre comigo, vão ter que me aguentar.

À *Rebeca*, eterna companheira de meet para estudarmos para as provas. Você tornou os estudos melhores e me apresentou a melhor mineira de todas.

Às minhas duplas e amigas da faculdade, *Bianca, Beatriz, Yasmine, Vitória*; pelo aprendizado em conjunto e perrengues juntas.

À *Júlia*, por me ter com tanto carinho e doses de patadas que só me reforçam o quanto ela me ama.

Aos meus amigos de Pereira, em especial *Mayuri e Geovanna*, que garantiram que eu sempre sentisse saudade de casa. Chegaram antes da faculdade e permanecerão após o término dela. Obrigada pelo apoio e amizade.

À *Mayara, Luciana e Mariana*, minhas companheiras de congregação em Araçatuba. Obrigada pela amizade e companhia.

Às minhas cadelinhas, porque fazem parte da família e foram minhas bolinhas anti estresse muitas vezes. Em especial à *Magali*, a 'cachorrinha de Araçatuba', que foi minha companheira e me ensinou a ter mais responsabilidade. Quão bom é chegar em casa e ser recebida com amor incondicional.

Aos *professores* da FOA/UNESP que formaram o profissional que me tornei e, mais que apenas a odontologia, me ensinaram a ser mais humana e empática. Em especial à Prof^a Daniela Micheline por me inserir em projetos lindos.

Ao grupo PET Odonto FOA por me abrir tantos caminhos e transformar minha caminhada acadêmica. Sempre tive e terei orgulho de levar o nome do grupo. Meu mais sincero 'obrigada' à professora *Alessandra*, por ver em mim capacidade que nem mesmo eu via.

Ao meu grupo de pesquisa: pós-graduandos (*Bharbara, Romulo, Rafaela e Julissa*), professor (*João*) e ic's (*Ana, Emili, Felipe, Gisele, Marissa, Isabela e Melissa*); que me acompanharam ao longo desses 2,5 últimos anos e me proporcionaram experiências únicas e tiveram muita paciência comigo. Graças a vocês que esse Trabalho está sendo entregue.

À *Rafaela*, minha querida pós, por todo carinho e apoio comigo. Não poderia ter uma 'chefa' melhor. Obrigada, Rafa. Você merece tudo e muito mais o que vem conquistando.

Ao professor *João* por me inserir em seus projetos. Eu sempre fui atrás de 'ic', mas nunca recebia atenção dos professores que procurava. O senhor foi o primeiro a me enxergar.

Ao COB e ao CAOÉ, centrinhos necessários e de tão grande importância. Minha passagem por eles foi enriquecedora.

Aos demais amigos que passaram por minha vida, levo cada um no coração e os tenho com tanto carinho!!

“E ainda que (...) conhecesse todos os mistérios e toda a ciência (...) e não tivesse caridade, nada seria”

Aos Coríntios 1-13.2

SANTOS, D. C. **Avaliação local do consumo profilático de vinho tinto sem álcool no desenvolvimento da periodontite apical induzida em ratos.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

RESUMO

A administração de resveratrol e quercetina reduz a inflamação e reabsorção óssea na periodontite apical (PA), mas o vinho tinto (VT) possui vários outros polifenóis. Por outro lado, o álcool aumenta o processo inflamatório na periodontite apical. O vinho tinto sem álcool (VTSA) pode ser uma alternativa promissora para se avaliar o efeito do conjunto de polifenóis sem o envolvimento do componente alcoólico. Não existem estudos que relacionem o efeito do VTSA com a PA. O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento da PA das lesões periapicais em ratos com dieta suplementada com consumo de VTSA e acompanhar o ganho de peso entre os grupos. Em sequência, 24 ratos albinos Wistar, todos recebendo a indução da PA, foram alocados em 3 grupos da seguinte forma: Controle (C), Vinho Tinto (VT) e Vinho Tinto sem Álcool (VTSA). A administração das soluções para cada grupo foi iniciada 15 dias antes da indução da PA e se manteve por 30 dias, numa concentração de 4,28 mL/kg via gavagem uma vez ao dia, volume correspondente a quantidade de 300 mL (duas taças) de VT. Após o período experimental, os animais foram eutanasiados para remoção das mandíbulas que foram submetidas à análise histológica e imunohistoquímica (IL-10, IL-1 β , TNF- α OPG, RANKL e TRAP) do tecido ósseo do local da PA. A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot 12.0TM com nível de significância de 5%. O grupo VTSA apresentou menor infiltrado inflamatório que o grupo C, maior imunomarcção para a proteína inibidora de osteoclastos OPG ($p=0.020$) que VT e C e menor imunomarcção para a proteína reguladora da formação de osteoclastos RANKL ($p=0.016$) e a proteína de ligação TRAP ($p=0.036$) contra o grupo C. O ganho de peso do grupo VT foi menor em comparação com os demais. Concluiu-se que a administração profilática de VTSA foi capaz de diminuir a inflamação e a reabsorção óssea em PA em comparação aos grupos C e VT.

Palavras-chave: periodontite apical; vinho; inflamação; remodelação óssea.

SANTOS, D. C. **Local evaluation of prophylactic consumption of non-alcoholic red wine in the development of induced apical periodontitis in rats.** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, 2024.

ABSTRACT

Administration of resveratrol and quercetin reduces inflammation and bone resorption in apical periodontitis (AP), but red wine (W) has several other polyphenols. On the other hand, alcohol increases the inflammatory process in AP. Non-alcoholic red wine (VTSA) may be a promising alternative to evaluate the effect of the set of polyphenols without the alcoholic component. There are no studies that relate the effect of VTSA with PA. This study aimed to evaluate the development of AP in periapical lesions in rats on a diet supplemented with VTSA consumption and monitor weight gain between groups. Subsequently, 24 albino Wistar rats, all receiving AP induction, were allocated into 3 groups as follows: Control (C), Red Wine (VT) and Non-alcoholic Red Wine (VTSA). The administration of solutions for each group was started 15 days prior to the AP induction and was kept for 30 days in a concentration of 4.28 mL/kg via gavage once a day, a volume corresponding to the amount of 300 mL of W. After the experimental period, the animals were euthanized to remove the jaws, which were subjected to histological and immunohistochemical analysis (IL-10, IL-1 β , TNF- α , OPG, RANKL and TRAP) of the bone tissue at the AP site. Statistical analysis was performed using the SigmaPlot 12.0TM program with a significance level of 5%. The VTSA group showed less inflammatory infiltrate than group C, greater immunostaining for the osteoclast inhibitory protein OPG ($p=0.020$) than VT and C and lower immunostaining for the osteoclast formation regulatory protein RANKL ($p=0.016$) and the protein TRAP binding ($p=0.036$) against group C. The weight gain of the VT group was lower compared to the others. It was concluded that VTSA prophylactic administration was able to diminish inflammation and bone resorption in AP in comparison to C and VT groups.

Keywords: apical periodontitis; wine; inflammation; bone remodeling.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Cronologia do experimento quanto a suplementação, indução de periodontite apical (PA), eutanásia e coleta das amostras 20
- Figura 2 - Fotomicrografias mostrando os aspectos histológicos e intensidade do processo inflamatório ao redor da abertura foraminal do primeiro molar inferior dos grupos C, VTSA e VT 26
- Figura 3 – Gráficos mostrando as pontuações medianas de imunomarcação para IL-10, IL-1 β , TNF- α , RANKL, OPG e TRAP na região periapical 28
- Figura 4 -Fotomicrografias mostrando a imunomarcação para IL-10, IL-1 α , TNF- α , RANKL, OPG e TRAP na região periapical

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela estatística das amostras coradas em HE

31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALC	Álcool
C	Controle
DAB	Tetracloridrato de diaminobenzidina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HE	Hematoxilina e eosina
HIF-1 α	Fator induzido por Hipóxia 1 alfa
HRP	Peroxidase de rábano / peroxidase de raiz forte
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina 1 beta
OPG	Osteoprotegerina
PA	Periodontite apical
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-TX	Triton X-100
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ativador de receptor do ligante do fator nuclear kappa-B
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
VT	Vinho tinto
VTSA	Vinho tinto sem álcool

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
4 RESULTADOS	25
4.1 Análise Histológica	25
4.2 Análise Imunohistoquímica	27
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35
ANEXOS	39

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical (PA) é uma doença inflamatória microbiana causada, principalmente, pela necrose da polpa dentária decorrente da contaminação dos canais radiculares (Siqueira; Rôças, 2007). Inflamação e respostas imunológicas do hospedeiro frente a essa doença podem promover reabsorção óssea na região apical (Subramanian; Mickel, 2009). Quando a lesão periapical está instalada, citocinas inflamatórias ou interleucinas modulam a resposta imune, iniciando e coordenando eventos celulares, e regulando a resposta do hospedeiro às endotoxinas (Kajiya *et al.*, 2010).

Na PA, a reabsorção óssea ocorre como um fator determinante à expansão destas lesões, iniciada pela proliferação de células precursoras de osteoclastos imaturos e diferenciação delas em células osteoclásticas maduras que promovem a degradação dos componentes ósseos orgânicos e inorgânicos. O tecido ósseo contém três principais tipos de células responsáveis pela sua composição: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. A remodelação e manutenção do tecido ósseo são reguladas através da síntese da matriz extracelular óssea por osteoblastos e a reabsorção da matriz extracelular por osteoclastos. Sob condições fisiológicas, existe um equilíbrio delicado entre a síntese e reabsorção óssea (Raggatt; Partridge, 2010).

O receptor ativador do fator nuclear- κ B ligante (RANKL) é uma molécula chave na ativação de osteoclastos e a osteoprotegerina (OPG) é um receptor para RANKL. O aumento na taxa de RANKL/OPG favorece a reabsorção óssea através de osteoclastogênese e ativação de osteoclastos (Kajiya *et al.*, 2010).

O vinho tinto (VT) é uma bebida consumida mundialmente (Kutlesa; Budimir Mrsic, 2016) e relacionada a diversos benefícios para a saúde como a prevenção e tratamento de doenças crônicas como doenças cardiovasculares, síndrome metabólica, declínio cognitivo, depressão e câncer (Pavlidou *et al.*, 2018). O VT é composto de água, etanol, glicerol, polissacarídeos, ácidos e apresenta uma complexa mistura de compostos bioativos que são predominantemente de natureza fenólica (Snopek *et al.*, 2018).

Evidências epidemiológicas sugerem que o consumo leve a moderado de bebidas alcoólicas possui efeitos benéficos sobre o tecido ósseo (Ilich *et al.*, 2002).

Em geral, o efeito benéfico do consumo regular e moderado de VT é obtido com aproximadamente 150 ml/dia para mulheres e 300 ml/dia para homens (Rotondo; Di Castelnuovo; Gaetano, 2001; Walzem, 2008). Em contrapartida, os efeitos benéficos do consumo leve- moderado de álcool não podem ser generalizados por conta das diferenças genéticas entre os diferentes grupos étnicos (Hu *et al.*, 2022), bem como pelo estilo de vida geral do indivíduo (tabagismo, falta de exercícios, hábitos alimentares etc.), que devem sempre ser avaliados e considerados. Argumenta-se ainda que o início do consumo de álcool em benefício da saúde não deve ser incentivado, pois um número substancial de doenças está associado aos efeitos nocivos do alto consumo de bebidas alcoólicas (Fernández-Solà, 2015).

Efeitos deletérios do álcool também têm sido observados na área de periodontia mostrando a redução da área óssea cortical, das taxas de formação óssea e das taxas de aposição mineral em ratos sob dieta líquida modificada contendo 8,1% v/v de álcool (Hogan *et al.*, 1997); ratas com periodontite induzida e consumo crônico de concentrações de álcool em 14%, 25% e 36% apresentaram agravamento da periodontite com aumento das respostas inflamatórias locais e reabsorção óssea (Almeida *et al.*, 2020). O álcool também prejudica a capacidade de glóbulos brancos em transferência para locais de lesão e infecção, provocando anormalidades funcionais nos linfócitos T e B, células natural killer e monócitos/macrófagos, além de alterar a produção de citocinas (Bautista e Wang, 2001; Deaciuc, 1997; Szabo, 1999).

Estudos anteriores (Dal Fabbro *et al.*, 2019) correlacionaram o consumo de álcool com efeitos maléficos na lesão periapical e observaram que o infiltrado inflamatório foi mais intenso em ratos suplementados com álcool comparado ao grupo controle, no qual os ratos foram suplementados com água. O grupo ALC mostrou os maiores valores para indicadores de osteoclastogênese TRAP, HIF-1 α e RANKL.

Pesquisas anteriores sobre os efeitos da ingestão de VT em ratos com periodontite periapical induzida (Dal Fabbro *et al.*, 2021) mostraram que a administração de VT diminuiu o processo inflamatório e reabsorção óssea, apresentando melhores resultados em comparação ao grupo ALC, o qual fez uso durante o experimento de solução alcoólica na concentração de 10%. Entretanto, o

grupo VT apresentou níveis de inflamação e reabsorção óssea maiores do que o grupo suplementado com os polifenóis Resveratrol + Quercetina ($p>0.05$). O grupo ALC apresentou os piores resultados, com alta reabsorção óssea, menor marcação para OPG, maior marcação para células TRAP positivas e processo inflamatório severo. Considerando os resultados conjuntamente, fortalece-se a hipótese de que o VT tem seus efeitos benéficos em função dos polifenóis e que o álcool tem um efeito antagônico em relação à prevenção da reabsorção óssea e inflamação durante o desenvolvimento da lesão periapical. Contudo, supõe-se que os resultados obtidos pelo grupo VT poderiam ser otimizados sem a interferência deletéria do álcool presente na bebida.

Uma possibilidade de se estudar os efeitos do VT sem a interferência do álcool é a utilização do vinho tinto sem álcool (VTSA). Nas duas últimas décadas houve um crescente interesse de enólogos e pesquisadores em buscar alternativas para reduzir o teor de álcool de vinhos e bebidas, a fim de atender à crescente demanda dos consumidores por bebidas sem álcool, mas com a mesma qualidade e toque sensorial. Assim, observou-se a crescente no mercado de vinhos não alcoólicos. As técnicas utilizadas para esse fim podem ser classificadas conforme o estágio de produção do vinho (estágio de pré-fermentação, fermentação e pós-fermentação) (Longo *et al.*, 2017; Sam *et al.*, 2021; Varela; Varela, 2019). Os compostos fenólicos, anteriormente descritos, presentes na uva, ao passarem pelo processo de fermentação do vinho, aumentam em concentração, sendo então capaz de se observar seus efeitos benéficos ao ingeri-lo. O mesmo não ocorre na produção de sucos de uva, por passarem por não passarem por um processo de fermentação.

A redução do álcool nesses estágios inclui a redução dos açúcares fermentáveis, a redução da produção de álcool, e separação por uma membrana ou aparelhos sem membrana, respectivamente. Também, técnicas de pós-fermentação têm sido usadas, como osmose reversa e destilação osmótica, para a remoção de até um teor inferior a 5% v/v sem alterar, significativamente, os principais parâmetros de qualidade do vinho (Corona *et al.*, 2019). Por fim, o processo de desalcoolização causa mínimas alterações nos componentes fenólicos do vinho (Belisário-Sánchez *et al.*, 2009; Corona *et al.*, 2019; Pham *et al.*, 2019).

Quando o conteúdo alcoólico foi reduzido de 14% para níveis inferiores a 0,3%, houve um aumento de aproximadamente 24% dos teores de compostos fenólicos, fenólicos totais, flavonol, éster tartárico e antocianina, além de resultar em um maior teor de resveratrol do que o vinho original (Belisário-Sánchez *et al.*, 2009). Adicionalmente, danos mínimos foram observados aos compostos fenólicos, como flavonóis, ésteres de tártaro, estilbenos (especificamente trans- e cis-resveratrol), flavonóis (ou seja, rutina, quercetina e miricetina), flavan-3-ols (principalmente (+)-catequina e (-)-epicatequina), antocianinas (em particular malvidina 3-glicosídeo) e não flavonóides (incluindo os ácidos gálico, cafeico e p-cumárico) na desalcoolização de vinhos elaborados com uvas merlot (Belisário-Sánchez *et al.*, 2009).

O aumento de compostos fenólicos no vinho, particularmente antocianinas, após a desalcoolização pode ser devido à redução da precipitação de sais de tartarato do vinho (Gil *et al.*, 2013). Também foi relatado que a desalcoolização em baixa temperatura (20°C) pode levar a uma maior retenção de polifenóis no vinho, como as antocianinas e o resveratrol (Banvolgyi *et al.*, 2016). Além disso, o aumento desses compostos pode resultar do efeito de concentração produzido pela remoção do álcool presente no vinho (Belisário-Sánchez *et al.*, 2009).

Sendo assim, o VTSA parece ser favorecido não só pela ausência do conteúdo alcoólico, mas também pela presença de um conjunto de diferentes compostos fenólicos. Até o momento, não há estudos que relacionem o consumo de VTSA com a endodontia, e mais especificamente, a sua possível ação no desenvolvimento da PA. A hipótese nula deste estudo é que a suplementação de VTSA resulta em níveis de inflamação e reabsorção óssea semelhantes à suplementação com água durante o desenvolvimento da PA induzida em ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar e comparar o desenvolvimento da PA em ratos Wistar com dieta suplementada com água, Vinho Tinto e Vinho Tinto Sem Álcool, via gavagem.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a intensidade do infiltrado inflamatório da lesão da PA em ratos Wistar, por meio da análise histológica, com peças coradas em HE;
- Analisar o ganho de peso dos ratos entre os grupos durante o experimento.
- Analisar e comparar histometricamente o perímetro da lesão da PA em ratos Wistar através da medição da área;
- Analisar o perfil inflamatório da lesão da PA em ratos Wistar, por meio da análise imunohistoquímica para as citocinas IL-1 β , TNF- α (pró-inflamatórias) e IL-10 (anti-inflamatória);
- Analisar o processo de remodelação óssea da lesão da PA em ratos Wistar, por meio da análise imunohistoquímica utilizando a expressão das proteínas TRAP, OPG e RANKL.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, o presente estudo foi cadastrado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais – CEUA.

Após, 24 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar) de três meses de idade, com 300g aproximadamente, provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba- UNESP foram utilizados no presente estudo.

Os animais foram mantidos em mini-isoladores (Alesco- Monte Mor, São Paulo, Brasil) com temperatura entre 22 e 24°C com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro), e alimentados durante todo o período experimental (45 dias) com dieta sólida e água “ad libitum”, exceto nas primeiras 12 horas pré intervenção, quando a dieta sólida não será oferecida.

Divisão em grupos

Cada grupo foi composto por 8 animais de acordo com a intervenção realizada:

- **Grupo Controle (C):** administração de água potável esterilizada;
- **Grupo Vinho Tinto Sem Álcool (VTSA):** administração de vinho tinto sem álcool (Vinh, Bento Gonçalves, RS, Brasil);
- **Grupo Vinho Tinto (VT):** administração de vinho tinto alcoólico (Vinh, Bento Gonçalves, RS, Brasil).

As soluções foram administradas via gavagem diariamente pela manhã por 45 dias, num volume igual a 4,28 mL/kg de peso corporal dos animais, conforme estudos anteriores (Schmatz et al., 2013; Dal Fabbro et al., 2021). Dose equivalente a uma pessoa de 70kg consumindo 300 mL de vinho tinto diariamente.

Acompanhamento do ganho de peso

Durante todo o experimento, 2 vezes na semana, terça-feira e sábado, antes de gavar os animais, pesávamos os mesmo para, ao fim do projeto, analisarmos o ganho de peso de cada grupo.

Foi utilizada balança digital de laboratório com prato para adequá-los melhor e o peso foi marcado, tanto para acompanhamento do aumento de peso, quanto para adequação do volume das soluções aplicadas.

Indução da periodontite apical

Para a cirurgia, os animais foram anestesiados via intramuscular, com um sedativo à base de Quetamina - 80 mg/kg (Avenco Inc., Fort Dodge, IA) e Xilazina - 4 mg/kg (Mebay Corp. Shawnee, KS). A abertura coronária dos primeiros e segundos molares inferiores do lado direito (2 dentes) foi realizada com auxílio de broca em aço carbono (Broca Ln Long Neck - Maillefer, Dentsply) com 0,5mm de diâmetro. Os dentes permaneceram abertos e a lesão foi analisada 30 dias após a indução da PA (Cintra *et al.*, 2016).

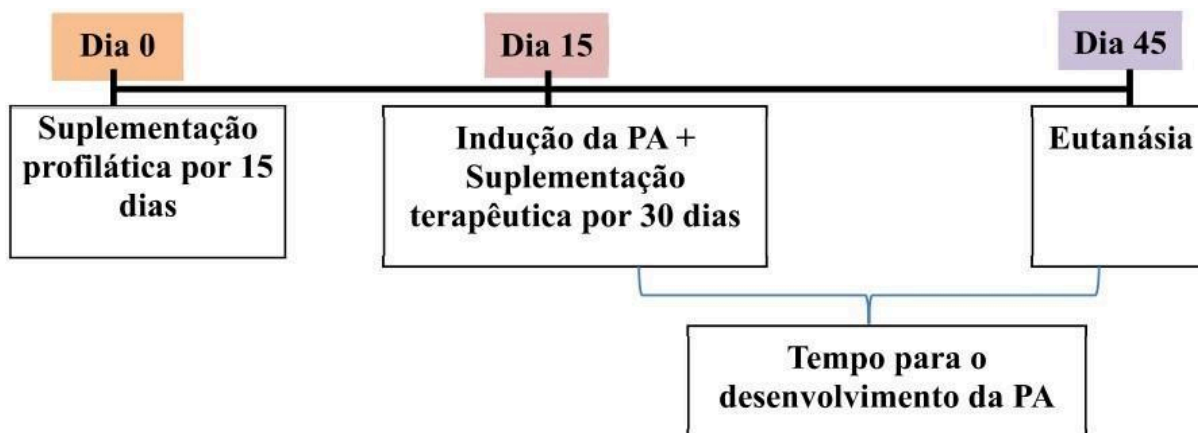
Avaliação da alteração de peso dos animais

Os animais foram pesados no início e ao final do experimento. A alteração de peso foi obtida em porcentagem considerando o peso inicial e final. Além disso, a quantidade de ração e água foram monitorados diariamente.

Períodos de observação

Decorridos 30 dias da indução da PA, os animais foram anestesiados, conforme protocolo descrito anteriormente, e eutanasiados com sobredose de anestésico (Cintra *et al.*, 2016) para a coleta das mandíbulas.

Figura 1 - Cronologia do experimento quanto a suplementação, indução de periodontite apical (PA), eutanásia e coleta das amostras



Fonte: Autor, 2024

Coleta das amostras e processamento laboratorial

Após a eutanásia, as hemimandíbulas direitas de cada animal foram removidas e fixadas em solução formalina a 10%, tamponadas com pH neutro, durante 24 horas e depois lavadas em água corrente por 12 horas. Após a fixação, as hemi mandíbulas foram desmineralizadas em solução de EDTA 10%, lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina.

Após a inclusão, foram obtidos cortes semi-seriados com 5 µm de espessura, realizados em micrótomo (Leica - RM2045). Para a técnica de coloração, os cortes foram desparafinizados em xilol, reidratados em série crescente de etanol e lavados em água corrente. Para a coloração de Hematoxilina e eosina (HE), foram corados em solução de Hematoxilina de Harris, lavados em água corrente, imersos em solução de Eosina e novamente lavados em água corrente. Posteriormente, os cortes foram desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e as lâminas montadas em Permount.

Já na imunohistoquímica, foi feita a recuperação antigênica através da imersão das lâminas histológicas em tampão, em câmara pressurizada a 95°C, por 10 minutos. Ao término de cada uma das etapas da reação imunohistoquímica foram efetuadas lavagens em tampão fosfato salino (PBS) 0,1M, pH 7,4. Os cortes histológicos foram imersos em 3% de peróxido de hidrogênio por 1 hora e em 1% de

soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente. As lâminas histológicas foram submetidas à incubação com seus respectivos anticorpos primários. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes foi empregado a estreptavidina. As secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotinilado, durante 2 horas, e posteriormente tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Na revelação foi empregado como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB) e em seguida a contra coloração foi realizada com hematoxilina de Harris. Posteriormente, os cortes foram desidratados em série crescente de etanol, diafanizados em xilol e as lâminas montadas em Permount. Os cortes foram submetidos à técnica de imunohistoquímica, para os marcadores biológicos IL-10, IL-1 β , TNF- α , OPG, RANKL e TRAP.

Análise Histológica

A raiz distal do primeiro molar inferior direito foi escolhida para esta análise. A análise histológica das mandíbulas serviu para caracterização do perfil inflamatório das lesões periapicais (Gomes-Filho *et al.*, 2015). Foram realizadas análises descritiva e qualitativa. As lâminas preparadas foram submetidas à microscopia de luz e as fotografias foram capturadas em objetivas 50x, 100x e 400x com a câmera digital acoplada. A análise descritiva consistiu na descrição dos fenômenos histopatológicos, procurando caracterizá-los globalmente em função das variáveis experimentais (Gomes-Filho *et al.*, 2015).

A análise qualitativa foi realizada por meio da atribuição de escores, graduando as magnitudes dos fenômenos histopatológicos de forma dissociada (Gomes-Filho *et al.*, 2015). A intensidade do processo inflamatório foi analisada na área periapical da raiz distal do primeiro molar inferior direito, em conformidade com o número médio aproximado de células inflamatórias presentes em diferentes campos de um mesmo espécime, examinados em aumento de 400x junto ao periápice dentário. Foram considerados escores: 0 (ausente ou poucas células

inflamatórias), escore 1 (até 25 células e reação leve), escore 2 (25-125 células inflamatórias e reação moderada) e escore 3 (mais de 125 células e reação grave) (Gomes-Filho *et al.*, 2015).

A análise histométrica foi realizada a fim de verificar se há diferença na perda óssea periapical de ratos entre os grupos. A área periapical associada à raiz distal do primeiro molar inferior direito, arredondando a fronteira da lesão, foi medida e expressa em milímetros quadrados usando Leica Microsystems Software (Leica, Wetzlar, Alemanha) (Gomes-Filho *et al.*, 2015).

Análise Imunohistoquímica

A raiz distal do primeiro molar inferior direito foi escolhida para esta análise. A análise imunohistoquímica foi realizada sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador cego e calibrado.

IL-10, IL-1 β , TNF- α , RANKL e OPG foram analisadas nas adjacências da lesão periapical com um aumento de 400x. A imunomarcacão foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no citoplasma das células e/ou na matriz extracelular. A análise qualitativa foi efetuada utilizando-se cinco secções histológicas de cada animal e ao padrão de imunomarcacão foi atribuído um escore. O critério para o estabelecimento dos escores foi adotado de acordo com (Gomes-Filho *et al.*, 2015) - 0 (ausência completa de células imunorreativas (IR)); 1 (IR baixo), poucas células imunorreativas e marcação fraca da matriz extracelular (aproximadamente um quarto das células IR); 2 (IR moderado), número moderado de células imunorreativas e marcação moderada da matriz extracelular (aproximadamente metade das células imunorreativas); e 3 (IR elevado), grande número de células IR e forte marcação da matriz extracelular (aproximadamente três quartos das células IR).

Somente osteoclastos maduros ou células multinucleadas TRAP-positivas foram quantificados. A reação de imuno-histoquímica foi realizada logo após a seleção da seção histológica para a medição da área da lesão. Esta medição determinou inicialmente o perímetro da lesão ao nível ósseo, e foi delimitada a

superfície externa do osso alveolar na área da lesão. As células multinucleadas foram quantificadas no perímetro e expressas em células TRAP-positivas multinucleadas por mm. A análise de TRAP foi realizada da seguinte forma: primeiro, cercando todo o perímetro da reabsorção óssea resultante da periodontite apical, seguido pela contagem das células multinucleadas TRAP positivas. Finalmente, a razão entre as células TRAP e a mensuração do perímetro foi obtida (Gomes-Filho *et al.*, 2015)

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do programa SigmaPlot 12.0™ (Chicago, IL, USA). A verificação da distribuição normal das variáveis contínuas quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk.

Para os valores quantitativos das análises que seguiram uma distribuição normal foi aplicado o teste ANOVA, enquanto para comparações múltiplas dos resultados entre os grupos estudados, foi utilizado o teste de Tukey.

Para as análises, foram atribuídos escores e para os valores que não seguiram uma distribuição normal, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn (1958). O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

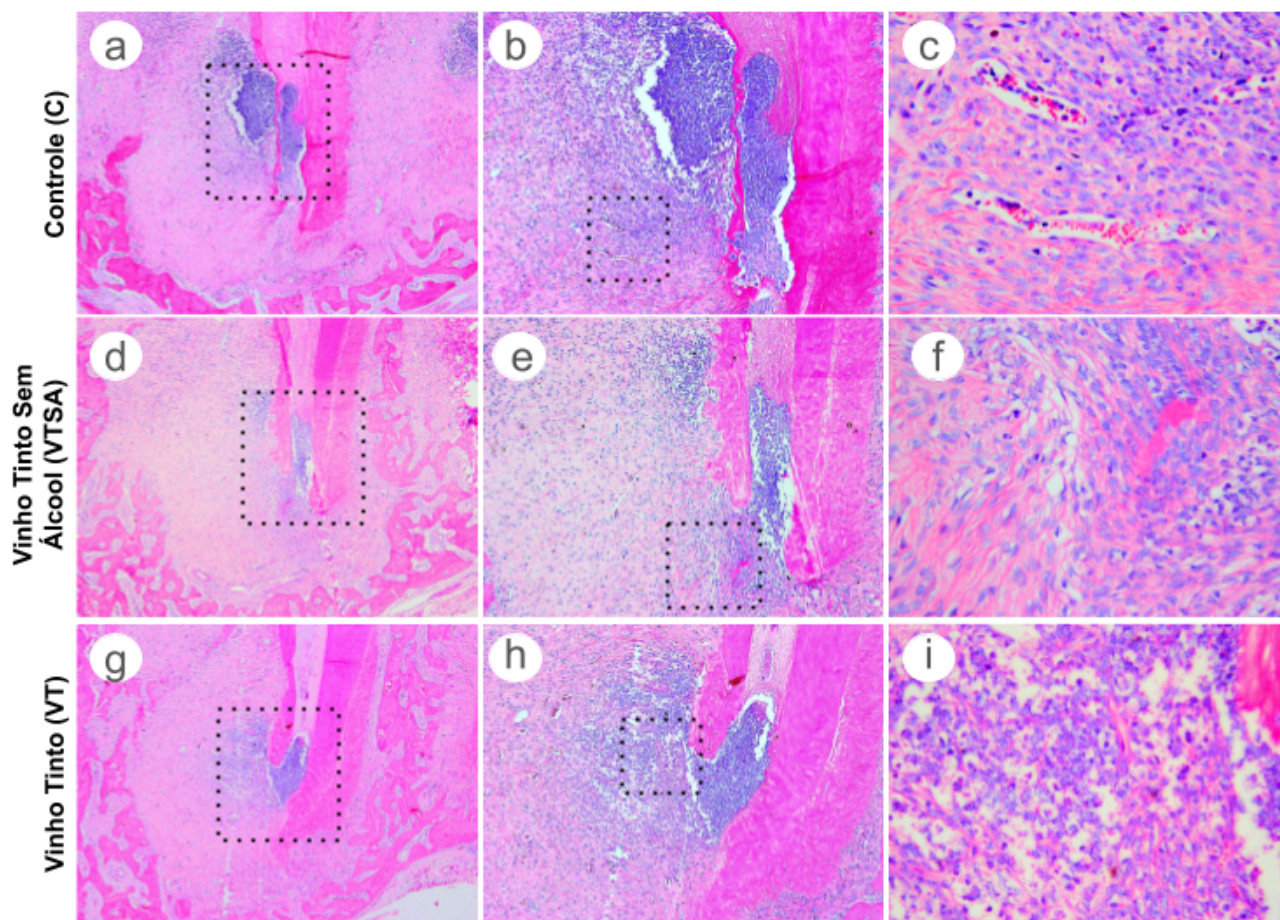
4 RESULTADOS

4.1 Análise Histológica

Os cortes representativos corados com HE são mostrados na Figura 2. Todos os animais submetidos à exposição pulpar apresentaram necrose pulpar com infiltrado inflamatório em região periapical, com destruição óssea associada, o que afirma a eficácia do método de exposição pulpar durante 30 dias utilizado no experimento. A tabela 1 mostra as medianas e escores atribuídos aos grupos. O grupo C apresentou nível de inflamação correspondente a mediana de escore 3, significativamente maior do que o processo inflamatório encontrado nos grupos VT e VTSA. Não houve diferença significativa quando o grupo VT (mediana dos escores 1,5) foi comparado com o grupo VTSA (mediana de escore 1).

No que concerne à média de ganho de peso entre os grupos, aquele suplementado com VT obteve o menor volume de ganho de peso durante o experimento, com diferença estatística contra os demais grupos. C e VTSA obtiveram ganho de peso semelhante entre si.

Figura 2 - Fotomicrografias mostrando os aspectos histológicos e intensidade do processo inflamatório ao redor da abertura foraminal do primeiro molar inferior dos grupos C, VTSA e VT



O processo inflamatório grave pode ser observado no grupo C (a, b e c nos aumentos de 50×, 100× e 400×, respectivamente). Processo inflamatório leve pode ser observado no grupo VTSA (d, e e f com aumento de 50×, 100× e 400×, respectivamente). O processo inflamatório leve a moderado pode ser observado no grupo VT (g, h e i com aumento de 50×, 100× e 400×, respectivamente).

Fonte: Autor, 2024

Tabela 1 - A média de ganho de peso dos animais e a área referente a lesão periapical estão expressas em média e desvio padrão ($\pm$). A intensidade do infiltrado inflamatório está expressa em mediana.

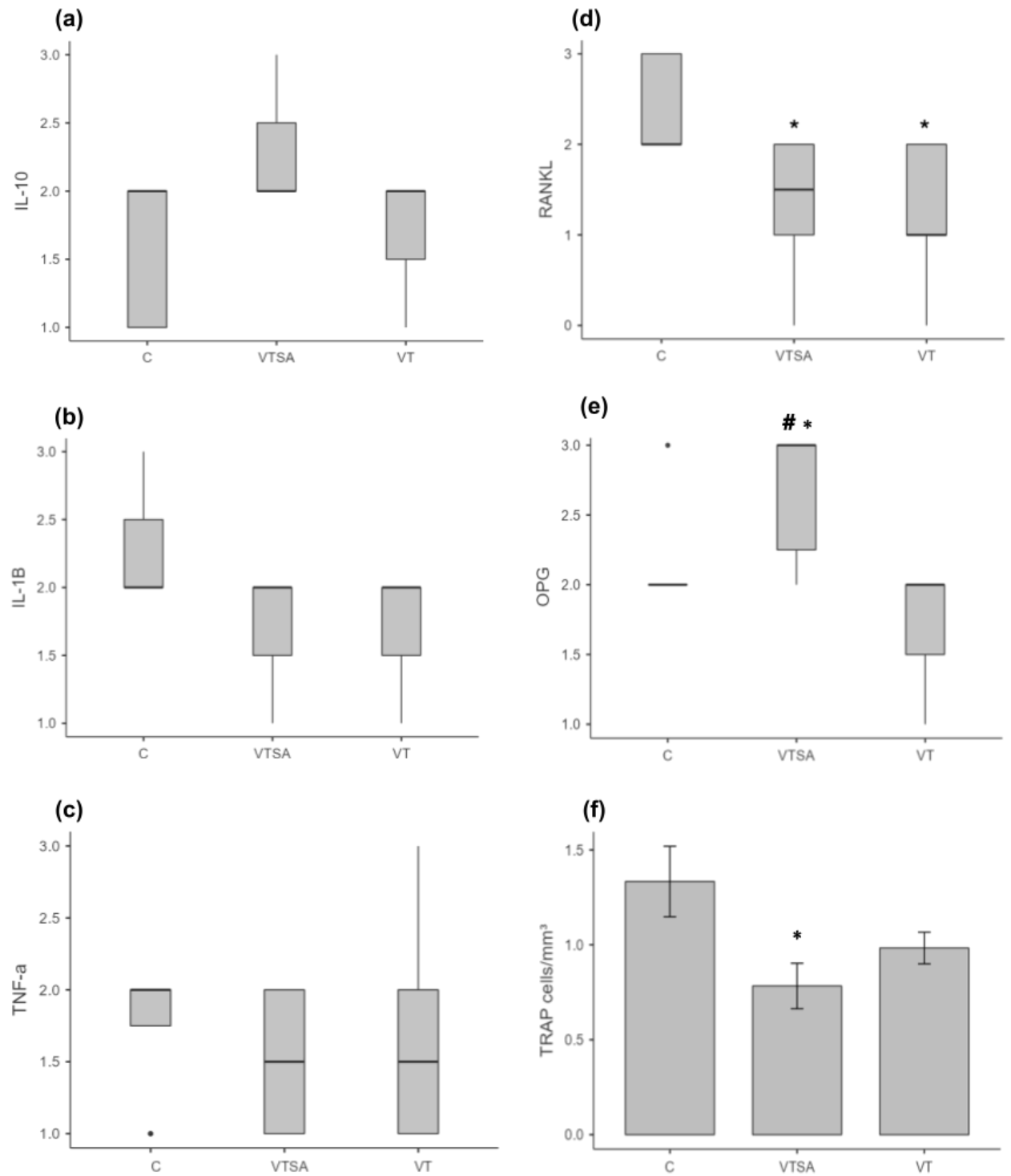
Grupos	Média do ganho de peso (%)	Área da lesão (mm ³)	Intensidade do infiltrado inflamatório (escores)				
			0	1	2	3	Mediana
C	38.411 $\pm$ 4.654 ^a	1759.010 $\pm$ 487.452 ^a	0/8	0/8	3/8	5/8	3.0 ^a
VTSA	33.172 $\pm$ 5.638 ^a	1772.460 $\pm$ 521.356 ^a	0/8	5/8	3/8	0/8	1.0 ^b
VT	29.078 $\pm$ 3.670 ^b	1744.158 $\pm$ 635.034 ^a	0/8	4/8	4/8	0/8	1.5 ^b

Fonte: Autor, 2024

4.2 Análise Imunohistoquímica

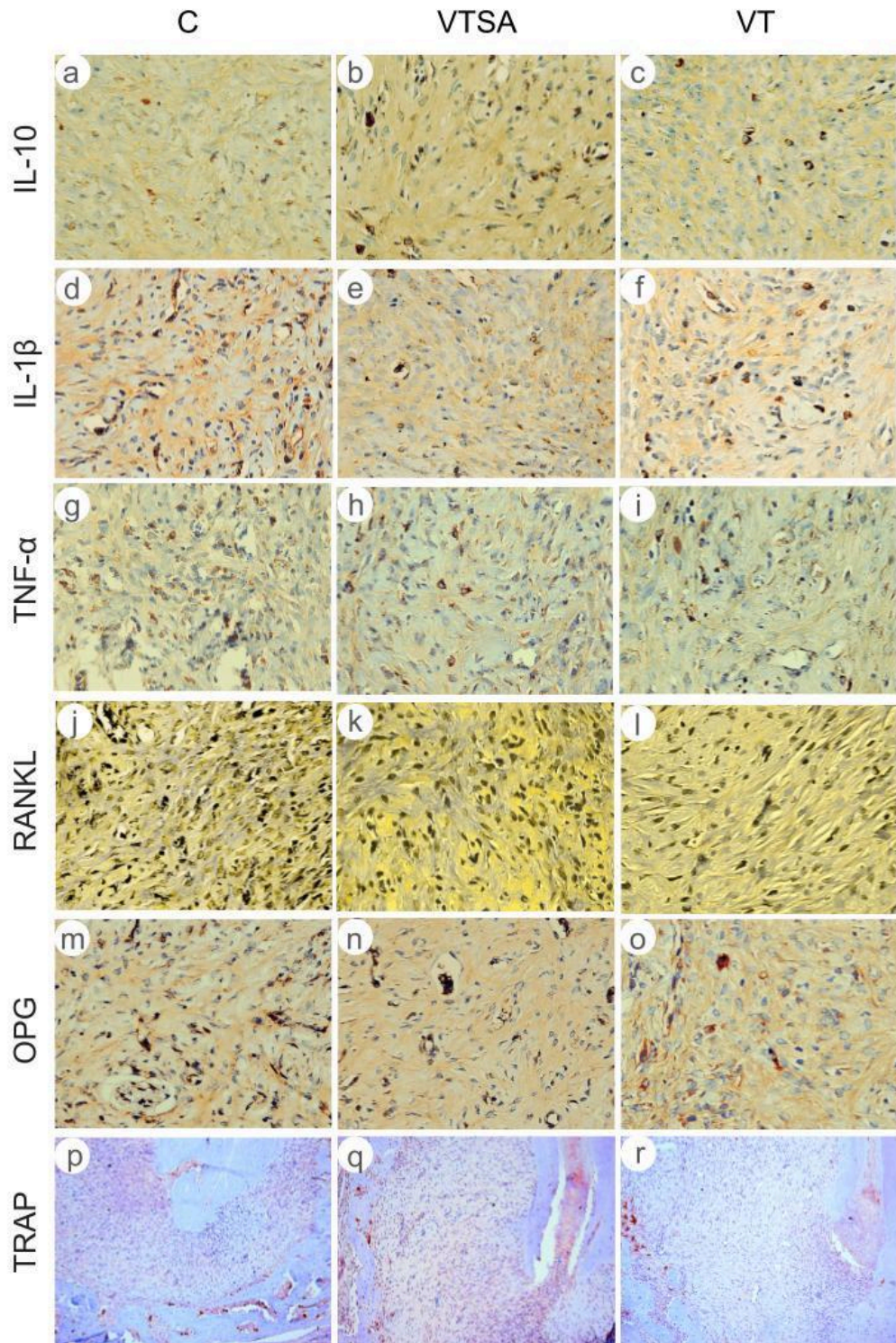
O padrão de imunorreatividade para IL-10, IL-1 β , TNF- α , RANKL, OPG e TRAP são descritos abaixo e nas Figuras 3 e 4. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ao avaliar a marcação de IL-10, IL-1 β e TNF- α ($p > 0.05$). Os grupos VTSA e VT apresentaram menor imunomarcação para a expressão de RANKL (mediana de escore 1,5), comparada ao grupo C (mediana de escore 2) ($p = 0.016$). O grupo VTSA apresentou maior imunomarcação para a expressão de OPG (mediana de escore 3), significativamente maior do que a encontrada para o grupo VT (mediana de escore 2) ($p = 0.020$). Além disso, o grupo VTSA apresentou uma menor imunomarcação para a expressão de células TRAP, significativamente menor do que a encontrada no grupo C ($p = 0.036$).

Figura 3 – Gráficos mostrando as pontuações medianas de imunomarcção para (a) IL-10, (b) IL-1 β , (c) TNF- α , (d) RANKL, (e) OPG e (f) TRAP na região da lesão periapical



Fonte: Autor, 2024

Figura 4 – Fotomicrografias mostrando a imunomarcacão para IL-10 (a, b, c), IL-1 β (d, e, f), TNF- α (g, h, i), RANKL (j, k, l), OPG (m, n, o) e TRAP (p, q, r) na periodontite periapical ao redor da abertura foraminal da raiz do primeiro molar inferior nos grupos C (a, d, g, j, m, p), Grupo VTSA (b, e, h, k, n, q) e Grupo VT (c, f, i, l, o, r). Contra coloração: Hematoxilina de Harris. Ampliação original para IL-10, IL-1 β , TNF- α RANKL, OPG: 400X com barras de escala: 100 μ m, e 100X para TRAP com barras de escala: 400 μ m



5 DISCUSSÃO

O presente estudo avalia o efeito do consumo profilático de vinho tinto sem álcool, por meio de gavagem, no desenvolvimento de periodontite apical em ratos. Seu uso tem como um dos objetivos, diminuir a preocupação de saúde pública sobre os efeitos deletérios do álcool e sua influência frente ao processo inflamatório da periodontite apical. Os resultados, em conformidade com estudos anteriores que correlacionam os polifenóis presente no VT com a PA (Dal Fabbro, 2021), revelaram um efeito benéfico de seu consumo na intensidade do processo inflamatório e na reabsorção óssea associada à periodontite apical.

No que diz respeito a análise do ganho de peso entre os grupos, em todos foi observado aumento de peso dos ratos durante o experimento. O grupo VTSA e o C obtiveram ganhos similares (33.17% e 29,07%, respectivamente). O grupo com menor ganho de peso foi o VT (29.07%). Um dos possíveis motivos para tais resultados é a presença do álcool na dieta, enquanto altamente calórico, os ratos sob ingestão dele sentem maior saciedade (Dal Fabbro et al., 2019).

A análise histológica mostrou um processo inflamatório associado a PA de menor extensão e intensidade nos grupos VT e VTSA (escores 1,5 e 1), em comparação com o grupo C (escore 3). Esse achado está de acordo com estudos publicados que comprovam a atividade anti-inflamatória dos polifenóis resultantes do processo de fabricação de vinho tinto (Dal Fabbro et al., 2021). Enquanto a análise histométrica, através da delimitação do perímetro da lesão, indicou que os grupos não tiveram diferenças estatisticamente significativas entre eles.

Embora o VT administrado no presente estudo tenha a concentração de álcool de 12,5%, o infiltrado inflamatório foi significativamente menor (escore 1,5) quando comparado ao grupo C (escore 3). Uma possível explicação é que a presença de compostos não alcoólicos presentes no VT, como os polifenóis, compensaram em parte o efeito prejudicial evocado pela concentração de álcool presente no VT (Esteban-Fernández *et al.*, 2017).

Observando os resultados encontrados no presente estudo, a citocina anti-inflamatória IL-10 não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A IL-10 é uma citocina que induz a supressão da resposta inflamatória nos mais variados tipos celulares, ou seja, anti-inflamatória, de importante fator

supressor para a doença periodontal e o desenvolvimento da periodontite apical, além de ser reguladora da homeostase óssea (Sasaki *et al.*, 2000, 2004). O mecanismo molecular de prevenção da perda óssea evocado pela IL-10 baseia-se na regulação positiva na expressão de OPG e na regulação negativa da expressão de RANKL (Cheng *et al.*, 2020). Ademais, é tida como a principal molécula responsável pela coordenação de reações inflamatórias, especialmente a inibição das alterações mediadas pelo TNF- α , citocina pró-inflamatória (Bleijs *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2001).

Os fatores TNF- α e IL-1 β agem sinergicamente na resposta inflamatória e, junto da citocina anti-inflamatória IL-10, são capazes de modular a resposta inflamatória frente a PA. Os níveis de TNF- α nos grupos VTSA e VT não obtiveram diferença significativa em comparação com o grupo C, apesar dos polifenóis da uva são supressores da liberação desse fator (Chen *et al.*, 2020; Lee; Moon, 2005; Lee *et al.*, 2019; Takada *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2020; Yuan *et al.*, 2018). Com relação à citocina pró-inflamatórias IL-1 β , os grupos VTSA e VT não apresentaram diferença estatística em comparação com o grupo C.

A citocina pró-inflamatória IL-1 β , secretada principalmente por monócitos e macrófagos, é um regulador-chave das respostas do hospedeiro à infecção microbiana, sendo frequentemente encontrada em níveis elevados na periodontite periapical persistente (Yang *et al.*, 2018). A IL-1 β produz inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxygenase-2 (Oliveira *et al.*, 2011), é um potente estimulador da degradação do tecido periodontal e suas propriedades incluem a promoção da reabsorção óssea e a produção de proteinases na degradação tecidual (Cheng *et al.*, 2020). Junto do TNF- α são as primeiras citocinas formadas após lesão tecidual ou infecção, levando a síntese em cascata de outros fatores importantes no processo infeccioso e inflamatório (Oliveira *et al.*, 2011).

TNF- α é uma citocina pró-inflamatória vital na perda óssea instigada pela periodontite, pois induz a expressão de importantes mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e metaloproteinases da matriz (Graves; Cochran, 2003). Ele atua no aumento da reabsorção óssea e desempenha papel essencial na resposta imune inata na defesa contra bactérias. Contudo, sua superestimulação pode levar a danos colaterais lesivos (Graves; Cochran, 2003). É um dos mediadores mais precoces e

potentes da resposta inflamatória (Oliveira *et al.*, 2011). Pela análise estatística das citocinas IL-10, IL-1 β e TNF- α , não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos C, VTSA e VT.

Contudo, os resultados das estatísticas que dizem respeito às citocinas ósseas, podemos observar diferenças estatisticamente significativas do grupo VTSA em comparação com os demais. A descoberta do sistema conjunto das citocinas RANKL e OPG é importante na biologia óssea no que diz respeito ao controle metabólico do osso, sendo eles, os mediadores dominantes da osteoclastogênese e a avaliação desse sistema é importante para avaliar o estado celular do tecido ósseo (Khosla, 2001). O controle do metabolismo ósseo é primordial para que se tenha a redução na reabsorção óssea em doenças inflamatórias (Hadjidakis; Androulakis, 2006).

O RANKL é um importante peptídeo que estimula a diferenciação. Quando ligado ao receptor RANK, age como ativador e estimulador de células da linhagem osteoclástica, como monócitos e macrófagos; aumentando assim, a reabsorção óssea (Boyce; Xing, 2008). OPG, por sua vez, é um receptor antagonista ao RANK, inibindo a formação de osteoclastos. Isso pois, ele bloqueia a ligação RANKL/RANK. Assim, modula o controle hormonal da osteoclastogênese e reabsorção óssea (Rodan; Martin, 1981).

A imunomarcção para o ligante RANKL foi estatisticamente maior para o grupo C (escore 2), enquanto os grupos VTSA e VT (escore 1,5 e 1) tiveram menor marcação, com diferença estatisticamente significativa. Tendo em vista que esse peptídeo é o ativador do responsável pela diferenciação osteoclástica, podemos concluir que os grupos VTSA e VT tiveram menos produção e consequente ação dos osteoclastos durante a resposta à periodontite apical (Khosla, 2001).

Em conformidade com os resultados do RANKL, o receptor OPG apresentou-se com maior imunomarcção no grupo VTSA (escore 3) que nos demais (C e VT = escore 2), com diferença estatisticamente significativa. O aumento da expressão do antagonista de RANK, OPG, unido à menor expressão do ligante de RANK, RANKL, torna o grupo VTSA aquele de maior modulação do controle hormonal da osteoclastogênese e reabsorção óssea.

Por fim, os dados confirmam que houve uma redução da reabsorção óssea periapical nos grupos com compostos fenólicos, ao se analisar os dados de células multinucleadas TRAP positivas por perímetro de periodontite apical. A área com menos células TRAP positivas marcadas foi a do grupo VTSA (0,783 TRAP cells/mm³), com diferença estatisticamente significativa. Os grupos VT e C obtiveram resultados semelhantes entre si.

Na análise estatística das citocinas RANKL, OPG e TRAP, foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos C, VTSA e VT. Assim como, na análise do infiltrado inflamatório, os grupos VTSA e VT obtiveram melhores resultados que o grupo C.

A suplementação com substâncias contendo polifenóis mostrou-se eficaz na diminuição da inflamação decorrente da PA e da consequente reabsorção óssea envolta da lesão. Mesmo o VT contendo álcool, foi possível observar resultados melhores que em comparação com o grupo C, pela presença de compostos fenólicos. O uso de VTSA foi capaz de modular a resposta inflamatória e reabsorviva frente a PA.

6 CONCLUSÃO

A PA induzida nos animais que receberam a administração de VTSA apresentou menor infiltrado inflamatório e reabsorção óssea apical que nos outros dois grupos, o que nega a hipótese nula deste estudo. O grupo VTSA evidenciou padrão inflamatório mais leve, com menor marcação de IL-10 e menor de IL-1 β e TNF- α do que os grupos C e VT. O ganho de peso dos animais do grupo VT foi menor que nos demais. O padrão de reabsorção foi mais alterado com a indução de VTSA mostrando mais imunorreação às marcações de OPG e menos de RANKL e TRAP, do que nos demais. Concluiu-se que a administração profilática de VTSA foi capaz de diminuir a inflamação e a reabsorção óssea em PA em comparação aos grupos C e VT.

REFERÊNCIAS

- Almeida JM, Pazmino VFC, Novaes VCN, Bomfim SRM, Nagata MJH, Oliveira FLP, Matheus HR, Ervolino E. Chronic consumption of alcohol increases alveolar bone loss. *PLoS One*. 2020;15(8):e0232731. doi: 10.1371/journal.pone.0232731.
- Bautista AP, Wang E. Chronic ethanol intoxication enhances the production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant and macrophage inflammatory protein-2 by hepatocytes after human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 vaccination. *Alcohol*. 2001;24(1):35-44. doi: 10.1016/S0741-8329(01)00140-9.
- Banvolgyi S, Savaş Bahçeci K, Vatai G, Bekassy S, Bekassy-Molnar E. Partial dealcoholization of red wine by nanofiltration and its effect on anthocyanin and resveratrol levels. *Food Sci Technol Int*. 2016;22(8):677-687. doi:10.1177/1082013216642331
- Belisario-Sánchez YY, Taboada-Rodríguez A, Marín-Iniesta F, López-Gómez A. Dealcoholized wines by spinning cone column distillation: phenolic compounds and antioxidant activity measured by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl method. *J Agric Food Chem*. 2009;57(15):6770-8. doi: 10.1021/jf900387g.
- Bleijds DA, Waal-Malefyt R, Figdor CG, van Kooyk Y. Co-stimulation of T cells results in distinct IL-10 and TNF- α cytokine profiles dependent on binding to ICAM-1, ICAM-2 or ICAM-3. *Eur J Immunol*. 1999;29(7):2248-58. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199907)29:07<2248:AID-IMMU2248>3.0.CO;2-9.
- Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):139-46. doi: 10.1016/j.abb.2008.03.018.
- Chen T, Zhang X, Zhu G, Liu H, Chen J, Wang Y, He X. Quercetin inhibits TNF- α induced HUVECs apoptosis and inflammation via downregulating NF- κ B and AP-1 signaling pathway in vitro. *Medicine*. 2020;99(38):e22241. doi: 10.1097/MD.00000000000022241.
- Cheng R, Wu Z, Li M, Shao M, Hu T. Interleukin-1 β is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. *Int J Oral Sci*. 2020;12(1):2. doi: 10.1038/s41368-019-0068-8.
- Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, de Lima VM, Gomes-Filho JE. Multiple apical periodontitis influences serum levels of cytokines and nitric oxide. *J Endod*. 2016;42(5):747-51. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.022.
- Corona O, Liguori L, Albanese D, Matteo M, Cinquanta L, Russo P. Quality and volatile compounds in red wine at different degrees of dealcoholization by membrane process. *Eur Food Res Technol*. 2019;245:2601-11. doi: 10.1007/s00217-019-03376-z.

Dal-Fabbro R, Marques de Almeida M, Cosme-Silva L, et al. Chronic alcohol consumption changes blood marker profile and bone density in rats with apical periodontitis. *J Investig Clin Dent*. 2019;10(3):e12418. doi:10.1111/jicd.12418

Dal-Fabbro R, Marques de Almeida M, Cosme-Silva L, et al. Effects of different alcohol concentrations on the development of apical periodontitis in rats. *Archives of Oral Biology*. 2019;108:e104538, <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104538>.

Dal-Fabbro R, Cosme-Silva L, Rezende Silva Martins de Oliveira F, et al. Effect of red wine or its polyphenols on induced apical periodontitis in rats. *Int Endod J*. 2021;54(12):2276-2289. doi:10.1111/iej.13633

Deaciuc IV. Alcohol and cytokine networks. *Alcohol*. 1997;14(5):421-30. doi: 10.1016/s0741-8329(97)00039-6.

Esteban-Fernández A, Zorraquín-Peña I, González de Llano D, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. The role of wine and food polyphenols in oral health *Trends Food Sci Technol*. 2017;69:118-30. doi: 10.1016/j.tifs.2017.09.008.

Fernández-Solà J. Cardiovascular risks and benefits of moderate and heavy alcohol consumption. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12(10):576-87. doi: 10.1038/nrcardio.2015.91.

Gil M, Esteruelas M, González E, Kontoudakis N, Jiménez J, Fort F, Canals JM, Hermosín-Gutiérrez I, Zamora F. Effect of two different treatments for reducing grape yield in *Vitis vinifera* cv Syrah on wine composition and quality: berry thinning versus cluster thinning. *J Agric Food Chem*. 2013;61(20):4968-78. doi: 10.1021/jf400722z.

Gomes-Filho JE, Wayama MT, Dornelles RC, Ervolino E, Coclete GA, Duarte PC, Yamanri GH, Lodi CS, Dezan-Júnior E, Cintra LT. Effect of raloxifene on periapical lesions in ovariectomized rats. *J Endod*. 2015;41(5):671-5. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.027.

Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*. 2003;74(3):391-401. doi: 10.1902/jop.2003.74.3.391.

Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1092:385-96. doi: 10.1196/annals.1365.035.

Hogan HA, Sampson HW, Cashier E, Ledoux N. Alcohol consumption by young actively growing rats: a study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. *Alcohol Clin Exp Res*. 1997;21(5):809-16.

Hu CY, Hung CL, Huang YC, Huang PH, Tseng DY, Lin YH, Sun FJ, Kao FJ, Yeh HI, Liu YY. Alcohol patch test with hue-saturation-value model analysis predicts ALDH2 genetic polymorphism. *Comput Biol Med*. 2022;147:105783. doi: 10.1016/j.combiomed.2022.105783.

Ilich JZ, Brownbill RA, Tamborini L, Crncevic-Orlic Z. To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly

women?. *J Am Coll Nutr.* 2002;21(6):536-544. doi: 10.1080/07315724.2002.10719252.

Kajiya M, Giro G, Taubman MA, Han X, Mayer MP, Kawai T. Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *J Oral Microbiol.* 2010;2:10.3402/jom.v2i0.5532. doi: 10.3402/jom.v2i0.5532.

Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001;142(12):5050-5. doi: 10.1210/endo.142.12.8536.

Kutlesa Z, Budimir Mrsic D. Wine and bone health: a review. *J Bone Miner Metabol.* 2016;34:11-22. doi: 10.1007/s00774-015-0660-8.

Lee B, Moon SK. Resveratrol inhibits TNF- α -induced proliferation and matrix metalloproteinase expression in human vascular smooth muscle cells. *J Nutr.* 2005;135(12):2767-73. doi: 10.1093/jn/135.12.2767.

Lee IT, Lin CF, Huang YL, Chong KY, Hsieh MF, Huang TH, Cheng CY. Protective mechanisms of resveratrol derivatives against TNF- α -induced inflammatory responses in rat mesangial cells. *Cytokine.* 2019;113:380-392. doi: 10.1016/j.cyto.2018.10.008.

Longo R, Blackman JW, Torley PJ, Rogiers SY, Schmidtke LM. Changes in volatile composition and sensory attributes of wines during alcohol content reduction. *J Sci Food Agric.* 2017;97(1):8-16. doi: 10.1002/jsfa.7757.

Moore KW, Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-65. doi: 10.1146/annurev.immunol.19.1.683.

Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. *Rev Bras Anesthesiol.* 2011;61(2):260-5. doi: 10.1590/S0034-70942011000200014.

Pavlidou E, Mantzorou M, Fasoulas A, Tryfonos C, Petridis D, Giaginis C. Wine: an aspiring agent in promoting longevity and preventing chronic diseases. *Diseases.* 2018;6(3):73. doi: 10.3390/diseases6030073.

Pham D-T, Stockdale VJ, Wollan D, Jeffery DW, Wilkinson KL. Compositional consequences of partial dealcoholization of red wine by reverse osmosis-evaporative perstraction. *Molecules.* 2019;24(7):1404. doi: 10.3390/molecules24071404.

Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 2010;285(33):25103-8. doi: 10.1074/jbc.R109.041087.

Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption--a hypothesis. *Calcif Tissue Int.* 1981;33(4):349-51. doi: 10.1007/BF02409454.

Rotondo S, Di Castelnuovo A, Gaetano G. The relationship between wine consumption and cardiovascular risk: from epidemiological evidence to biological plausibility. *Ital Heart J.* 2001;2(1):1-8.

Sam FE, Ma TZ, Salifu R, Wang J, Jiang YM, Zhang B, Han SY. Techniques for dealcoholization of wines: their impact on wine phenolic composition, volatile composition, and sensory characteristics. *Foods*. 2021;10(10):2498. doi: 10.3390/foods10102498.

Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang CY, Uchiyama T, Müller R, Stashenko P. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol*. 2000;165(7):3626-30. doi: 10.4049/jimmunol.165.7.3626.

Sasaki H, Okamatsu Y, Kawai T, Kent R, Taubman M, Stashenko P. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. *J Periodontal Res*. 2004;39(6):432-41. doi: 10.1111/j.1600-0765.2004.00760.x.

Schmatz R, Mann TR, Spanevello R, Machado MM, Zanini D, Pimentel VC, Stefanello N, Martins CC, Cardoso AM, Bagatini M, Gutierrez J, Leal CA, Pereira LB, Mazzanti C, Schetinger MR, Morsch VM. Moderate red wine and grape juice consumption modulates the hydrolysis of the adenine nucleotides and decreases platelet aggregation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Biophys*. 2013;65(2):129-43. doi: 10.1007/s12013-012-9407-5.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J*. 2007;18(4):267-80. doi: 10.1590/s0103-64402007000400001.

Snopek L, Mlcek J, Sochorova L, Baron M, Hlavacova I, Jurikova T, Kizek R, Sedlackova E, Sochor J. Contribution of red wine consumption to human health protection. *Molecules*. 2018;23(7):1684. doi: 10.3390/molecules23071684.

Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod*. 2009;35(7):950-7. doi:10.1016/j.joen.2009.04.010.

Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol*. 1999;34(6):830-41. doi: 10.1093/alcalc/34.6.830.

Takada Y, Bhardwaj A, Potdar P, Aggarwal BB. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene*. 2004;23(57):9247-58. doi: 10.1038/sj.onc.1208169.

Varela J, Varela C. Microbiological strategies to produce beer and wine with reduced ethanol concentration. *Curr Opin Biotechnol*. 2019;56:88-96. doi: 10.1016/j.copbio.2018.10.003.

Walzem RL. Wine and health: state of proofs and research needs. *Inflammopharmacology*. 2008;16(6):265-71. doi: 10.1007/s10787-008-8027-6.

Wang M, Weng X, Chen H, Chen Z, Liu X. Resveratrol inhibits TNF- α -induced inflammation to protect against renal ischemia/reperfusion injury in diabetic rats. *Acta Cir Bras*. 2020;35(5):e202000506. doi: 10.1590/s0102-865020200050000006.

Yang NY, Zhou Y, Zhao HY, Liu XY, Sun Z, Shang JJ. Increased interleukin 1 α and interleukin 1 β expression is involved in the progression of periapical lesions in primary teeth. *BMC Oral Health*. 2018;18(1):124. doi: 10.1186/s12903-018-0586-3.

Yuan Z, Min J, Zhao Y, Cheng Q, Wang K, Lin S, Luo J, Liu H. Quercetin rescued TNF- α -induced impairments in bone marrow-derived mesenchymal stem cell osteogenesis and improved osteoporosis in rats. *Am J Transl Res*. 2018;10(12):4313-21.

ANEXOS

ANEXO A - Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeito do consumo de vinho tinto sem álcool no desenvolvimento da periodontite apical induzida em ratos"**, Processo FOA nº 0221-2022, sob responsabilidade de João Eduardo Gomes Filho apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 25 de Abril de 2022.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 30 de Maio de 2025.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 30 de Junho de 2025.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Effect of alcohol-free red wine consumption on the development of induced apical periodontitis in rats"**, Protocol FOA nº 0221-2022, under the supervision of João Eduardo Gomes Filho presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 25, 2022.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 30, 2025.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 30, 2025.

Prof. Dr. João Carlos Callera
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua.foa@unesp.br