



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

Fred Lucas Pinto Oliveira

**Avaliação dos níveis da fosfatase alcalina
no consumo crônico de diferentes
concentrações de álcool na periodontite
experimental**

Araçatuba – SP

2015

Fred Lucas Pinto Oliveira

**Avaliação dos níveis da fosfatase alcalina
no consumo crônico de diferentes
concentrações de álcool na 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

2015

Dedicatória

*Agradeço a **Deus**, o autor da vida, por me permitir sonhar e realizar meus objetivos, por sua graça e bondade na minha vida, mesmo não sendo merecedor de tantas conquistas; à minha mãe **Eunice**, meu porto seguro, por seu cuidado, amor, carinho e paciência nos dias que tudo parecia estar perdido e fora de controle; ao meu pai **Fernando**, pelas noites em claro que passou trabalhando para que pudesse me auxiliar; aos meus irmãos **Fernando Jr.** e **Gabriella**, pelas conversas, discussões, risadas, companheirismo, vocês são especiais; aos meus avós **Arnaldo** e **Emi**, pelas orações, conversas e conselhos, como é bom ter vocês; aos demais **familiares** que me ajudaram direta e indiretamente em tudo que precisei, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui; aos **Amigos**, a faculdade nos afastou um pouco, mas o sentimento quando nos encontramos é o mesmo, vocês fazem falta. Por todos estes motivos e por inúmeros outros que eu dedico a vocês mais esta conquista e deixo registrada minha imensa gratidão.*

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^a. Adj. Denise Pedrini Ostini, e a Doutouranda Vivian Cristina Noronha Novaes, pela disponibilidade em avaliar o meu trabalho, contribuindo para minha formação.*

*À Prof.^a Ass. Dr.^a **Suely Regina Mogami Bomfim** pela disponibilidade e dedicação e por ser fundamental 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**, quero agradecer primeiramente pelo convite que me foi feito para ser seu orientado, participar de um projeto de pesquisa, e me apresentar a vida científica. Foram 3 anos de uma ótima convivência, auxiliando em dias de clínica, preparação para apresentação em Congressos, cirurgias em animais e tantas outras coisas; aprendi que além de um excelente professor é um ótimo profissional e amigo. Obrigado pela competência, dedicação, paciência e confiança depositada em mim. Deixo aqui minha admiração e gratidão por tudo que me proporcionou durante este tempo que trabalhamos juntos.*

*A Doutoranda **Vivian Cristina Noronha Novaes**, mulher competente e admirada, por sempre me socorrer quando não sabia o que tinha que fazer, pelo tempo que deixou de ficar com sua família e dedicou a me ajudar, pelos conselhos, conversas, broncas, pelos bolos que levava nos dias de estágio, bons momentos. Obrigado pelo auxílio em todas as etapas do TCC, por sua disponibilidade e paciência. Sou imensamente grato a Deus por ter colocado pessoas tão especiais em minha vida para me ajudar a caminhar.*

*Aos Mestrandos **Fabrizio Cabrera Pazmiño e Nathália Januário Araújo**, por terem me aceitado para trabalhar juntamente em seu projeto de pesquisa, pelo ensino, dedicação e execução de vários procedimentos.*

Á todos os amigos que fiz no departamento e ao longo desses anos, conhecidos, familiares que estiveram comigo nesta caminhada, me apoiando, incentivando e desejando o meu melhor.

“Aquele que anda com os sábios será cada vez mais sábio.”

Provérbios 13:20.

OLIVEIRA, FLP. **Avaliação dos níveis da fosfatase alcalina no consumo crônico de diferentes concentrações de álcool na periodontite experimental.** Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

Resumo

É conhecido que uma complexa interação entre a microbiota subgengival e a resposta do hospedeiro no estabelecimento e progressão da destruição periodontal, principalmente em indivíduos que apresentam fatores ambientais. O presente estudo teve por objetivo, avaliar do ponto de vista bioquímico, os efeitos das diferentes concentrações de álcool sobre os níveis séricos da fosfatase alcalina, nos tecidos periodontais e na evolução da periodontite experimental. Para tanto, foram utilizados 80 ratos machos divididos em 4 grupos de 20 animais, sendo: Grupo Controle (C = 20): Ratos normais, com periodontite experimental induzida; Grupo Álcool 14% (A-14 = 20): Ratos com periodontite experimental induzida e expostos ao álcool na concentração de 14%; Grupo 25% (A-25 = 20): Ratos com periodontite experimental induzida e expostos ao álcool na concentração de 25%; Grupo Álcool 36% (A-36 = 20): Ratos com periodontite experimental induzida e expostos ao álcool na concentração de 36%. Os animais do Grupo Álcool receberam 30 dias antes da indução da periodontite experimental, solução alcoólica nas concentrações de 14%, 25% e 36% v/v. Após este período, foi induzida a periodontite experimental em todos os animais no primeiro molar inferior com distribuição randômica entre eles. Foram obtidas amostras sanguíneas previamente o início da administração das soluções alcólicas e em todos os momentos experimentais para avaliação dos níveis de fosfatase alcalina em todos os grupos. Cinco animais de cada grupo experimental foram eutanasiados nos períodos de 3, 7, 15 e 30 dias após indução da periodontite experimental. Os dados coletados foram avaliados estatisticamente com nível de significância de 5%.

Palavras-chave: Perda óssea alveolar, Fosfatase alcalina, Doença periodontal, Álcool, Ratos.

OLIVEIRA, FLP. **Alkaline phosphatase levels of assessment in the chronic consumption of different alcohol concentrations in experimental periodontitis.** Trabalho de conclusão de curso – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2015.

Abstract

It is known that a complex interaction between subgingival microbiota and host response in the establishment and progression of periodontal destruction, especially in individuals with environmental factors. This study aimed to evaluate the biochemical point of view, the effects of different concentrations of alcohol on serum phosphatase alkaline, in periodontal tissues and in the evolution of experimental periodontitis. For this, we used 80 male rats divided into 4 groups of 40 animals each: control group (C = 20): normal rats with experimentally induced periodontitis; Alcohol Group 14 % (A-14 = 20): rats with experimental periodontitis induced and exposed to alcohol at a concentration of 14 %, Group 25 % (A-25 = 20): Rats with induced and exposed to alcohol at a concentration of 25 % experimental periodontitis; alcohol Group 36 % (A-36 = 20): Rats with induced and exposed to alcohol at a concentration of 36 % experimental periodontitis. The animals Alcohol Group received 30 days before the induction of experimental periodontitis alcoholic solution at concentrations of 14 %, 25 % and 36 % v/v. After this period, the experimental periodontitis in all animals in the first molar with randomization among them was induced. Blood samples were obtained prior to beginning administration of alcoholic solutions and all you experience times for assessment of alkaline phosphatase levels in all groups. Five animals from each experimental group were euthanized at periods of 3, 7, 15 and 30 days after induction of experimental periodontitis. The data collected will be evaluated statistically with a significance level of 5%.

Keywords: Alveolar bone loss, Alkaline phosphatase, Periodontal disease , Alcohol, Mice.

Lista de Figuras

Figura 1	Média e Desvio Padrão dos níveis de FA no plasma nos diferentes grupos e períodos experimentais	19
Figura 2	Frascos de Xilazina (6mg/kg) e Quetamina (70mg/Kg)	32
Figura 3	Solução alcóolica acondicionada em bebedouro	32
Figura 4	Indução da Periodontite Experimental	33
Figura 5	Punção cardíaca	33
Figura 6	Frasco com gel separador	34
Figura 7	Centrífuga	34
Figura 8	Kit da Fosfatase Alcalina	35
Figura 9	Espectrofotômetro	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.....	11
2 Materiais e Métodos	14
2.1 Animais.....	14
2.2 Sedação e Anestesia.....	14
2.3 Grupos Experimentais	15
2.4 Administração do Álcool.....	15
2.5 Método de Indução da Periodontite Experimental (PE).....	15
2.6 Coleta Sanguínea e Períodos de Análise	16
2.7 Linha do Tempo	16
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.....	21
5 Conclusão	25
Referências	26

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; KORNMAM, 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 (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, tendo um crescimento de 154,8% per capita, colocando o Brasil entre os 25 países que mais consomem bebida alcoólica (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 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 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1992). O impacto do consumo excessivo de álcool no sistema imunológico e o aumento da predisposição à ocorrência de diversas infecções têm sido apontados na literatura (DURYEE et al., 2007; REHM; PARRY, 2009; ROMEO et al., 2010; 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, 1972).

A literatura tem ressaltado a importância de se avaliar os efeitos adversos do álcool sobre o periodonto (CLARKE; HIRSCH, 1995; HEITZ-MAYFIELD, 2005; STANFORD; REES, 2003). Estudos clínicos (AMARAL et al., 2008, 2011; LAITINEN; VÄLIMÄKI, 1991; TEZAL et al., 2001; TOMOFUJI et al., 2008) e em animais (DANTAS et al., 2012, MIJARES et al., 2012; TORRUNGRUANG 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, 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, 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 JÚNIOR, 2010), 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., 2009; 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 do ponto de vista bioquímico os efeitos das diferentes concentrações de álcool sobre os níveis séricos de FA, nos tecidos periodontais e na evolução da 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 B). 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. 2), 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 4 (quatro) grupos experimentais. Os grupos foram definidos de acordo com os seguintes tratamentos:

Grupo Controle (C = 20): Ratos normais, com periodontite experimental induzida.

Grupo Álcool 14% (A-14 = 20): Ratos com periodontite experimental induzida e expostos ao álcool na concentração de 14%.

Grupo Álcool 25% (A-25 = 20): Ratos com periodontite experimental induzida e expostos ao álcool na concentração de 25%.

Grupo Álcool 36% (A-36 = 20): Ratos com periodontite experimental induzida e expostos ao álcool na concentração de 36%.

2.4 Administração do Álcool

Os animais do Grupo Álcool receberam solução alcoólica na concentração de 14%, 25% e 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. 3).

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;

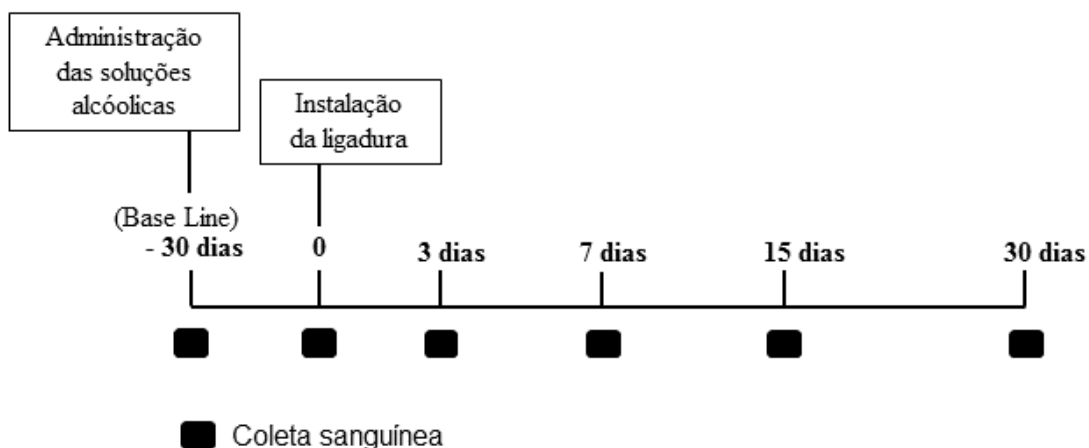
Coats Corrente, SP, Brasil) ao redor dos primeiros molares inferiores, distribuído randomicamente entre o lado direito e esquerdo, ao nível do sulco gengival, e mantidos por meio de nós cirúrgicos (Fig. 4). Até o final do experimento esta ligadura atuou como irritante gengival favorecendo o acúmulo de placa bacteriana (Johnson, 1975).

2.6 Coleta Sanguínea e Períodos de Análise

Foram coletados 3 ml de sangue por punção cardíaca (Fig. 5) de todos os animais nos momentos -30 dias (Baseline), 0 dias (imediatamente antes da indução da PE) e em 5 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. 6) e permaneceram em repouso por um período de 20 min. Após esse período as amostras foram centrifugadas (Centribio-TDLS0-2B, Diadema, SP, Brasil) (Fig. 7) com 3000 RPMs por 10 minutos para obtenção do soro.

O soro obtido foi aliqotado em 2 tubos e congelado em -20°C até o momento da análise. O volume de 20 μL foi utilizado para determinação da FA.

A determinação da FA sérica foi realizada pelo método cinético de acordo com as recomendações do fabricante (Labtest[®], Lagoa Santa, MG, Brasil) (Fig. 8) e analisados em espectrofotômetro semi-automatizado (SB-190 Celm, Barueri, SP, Brasil) (Fig. 9).

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 absorvância 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[®], 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 $37 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$, 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 para as medidas dos dados coletados para FA, entre os diferentes grupos e períodos foi testada utilizando o software 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 dados expressos em U/L para FA nos diferentes grupos experimentais estão dispostos na Tabela 1.

Análise Intragrupo

Na análise Intragrupo, foi possível observar que o Grupo C apresentou diferença estatisticamente significativa, com menor nível de FA nos períodos de 3 dias ($164 \pm 70,56$), 7 dias ($189,8 \pm 111,30$), 15 dias ($194,7 \pm 26,43$) e 30 dias ($251,1 \pm 128,73$) dias após a indução da PE quando comparado aos períodos Baseline ($308,35 \pm 66,39$) e 0 dias ($257,07 \pm 63,11$). Os Grupos A-14% no dia 0 ($184,5 \pm 57,52$), aos 3 dias ($165 \pm 42,96$), 7 dias ($164,5 \pm 36,83$), 15 dias ($181,3 \pm 46,99$) e 30 dias ($226 \pm 28,53$) apresentaram diferença estatística com menor nível de FA quando comparado ao Baseline A-14% ($286,21 \pm 56$); Grupo A-25% no dia 0 ($160,66 \pm 21,5$), aos 3 dias ($163,33 \pm 22,08$), 7 dias ($165,44 \pm 48,66$), 15 dias ($167,22 \pm 22,23$) e 30 dias ($145,55 \pm 29,04$) apresentaram diferença estatística com menor nível de FA quando comparado ao Baseline A-25% ($242 \pm 61,25$); O Grupo A-36% no dia 0 ($212,33 \pm 62,13$), aos 3 dias ($140,75 \pm 55,16$), 7 dias ($151,5 \pm 23,81$), 15 dias ($173,12 \pm 42,71$) e 30 dias ($135,44 \pm 30,61$) apresentaram diferença estatística com menor nível de FA quando comparado ao Baseline A-36% ($226,64 \pm 55,54$). O grupo A-14% teve seu incremento mais marcado aos 30 dias ($226 \pm 28,53$), o grupo A-25% aos 15 dias ($167,22 \pm 22,23$) e o grupo A-36% ($151,5 \pm 23,81$) aos 7 dias após a PE (Figura 1).

Análise Intergrupo

Na análise intergrupos aos 30 dias os Grupos A-25% ($145,55 \pm 29,04$) e A-36% ($135,44 \pm 30,61$) apresentaram diferença estatística com menor nível de FA quando comparado ao Grupo C ($251,1 \pm 128,73$) e A-14% ($226 \pm 28,53$) no mesmo período experimental (Figura 1).

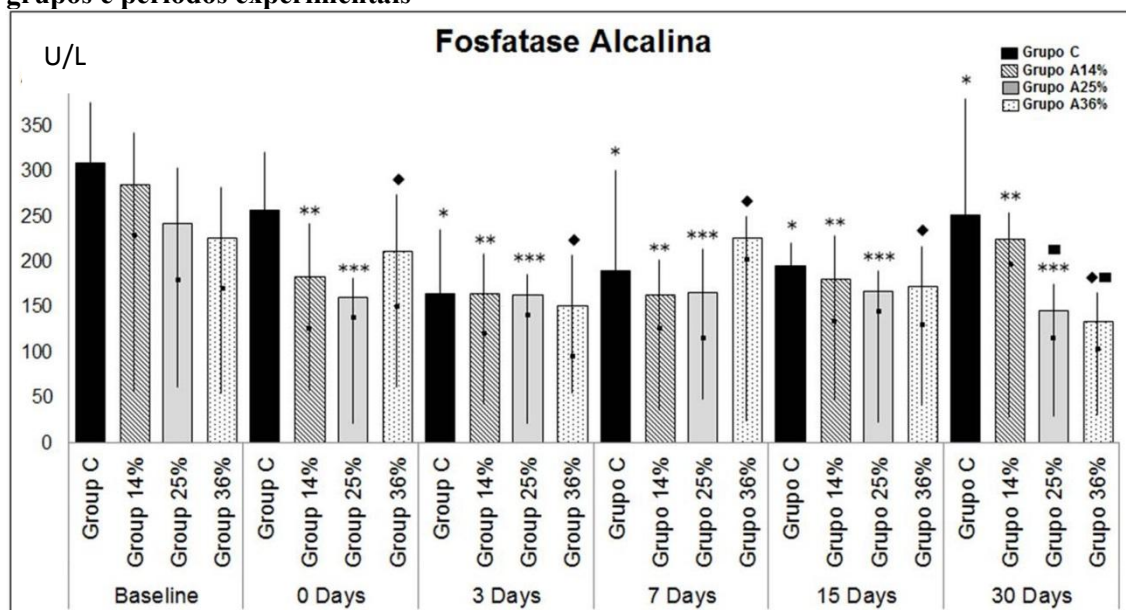
Tabela 1 - Atividade da FA em animais com PE e expostos a distintas concentrações de álcool

	BASELINE (U/L)	0 DIAS (U/L)	3 DIAS (U/L)	7 DIAS (U/L)	15 DIAS (U/L)	30 DIAS (U/L)
C	308,35±66,39	257,07±63,11	164±70,56	189,8±111,30	194,7±26,43	251,1±128,73
A-14%	286,21±56	184,5±57,52	165±42,96	164,5±36,83	181,3±46,99	226±28,53
A-25%	242±61,25	160,66±21,50	163,33±22,08	165,44±48,66	167,22±22,23	145,55±29,04
A-36%	226,64±55,54	212,33±62,13	140,75±55,16	151,5±23,81	173,12±42,71	135,44±30,61

- M±DP = Valores de Média ± Desvio-Padrão; U/L = Unidades por litro.
- C = Grupo Controle; A-14% = Grupo Álcool 14%; A-25% = Grupo Álcool 25%; A-36% = Grupo Álcool 36%.

Fonte: Do Autor

Figura 1 - Média e Desvio-Padrão (M±DP) dos níveis de FA no plasma nos diferentes grupos e períodos experimentais



Símbolos: Análise Intragrupo: * – Diferença estatisticamente significativa entre os Grupos Controle dos períodos 3, 7, 15 e 30 dias, quando comparado com o mesmo grupo nos períodos Baseline e 0 dias; ** – Diferença estatisticamente significativa entre o Grupo 14% nos períodos 0, 3, 7, 15 e 30 dias, quando comparado com o mesmo grupo no período Baseline; *** – Diferença estatisticamente significativa entre o Grupo 25% nos períodos 0, 3, 7, 15 e 30 dias, quando comparado com o mesmo grupo no período Baseline. ♦ – Diferença estatisticamente significativa entre o Grupo 36% nos períodos 0, 3, 7, 15 e 30 dias, quando comparado com o mesmo grupo no período Baseline. Análise Intergrupo: ■ – Diferença estatisticamente significativa dos Grupos 25% e 36% do período 30 dias, quando comparado com o Grupo Controle do mesmo período experimental (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey $p \leq 0,05$).

Fonte: Do Autor

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; BEZERRA 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 alcoólica na concentração de 14%, 25% e 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 e 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.

A Fosfatase Alcalina é uma enzima secretada no soro e é usada para analisar a atividade óssea relacionada com aposição óssea, porém pode ser relacionada com a periodontite pelo envolvimento do tecido ósseo subjacente com destruição óssea evidente na doença periodontal (PERUMAL et al., 2014). Como consequência da disfunção hepática, pacientes cirróticos têm níveis elevados de FA, manifestando-se nos tecidos periodontais durante a progressão da periodontite (JAISWAL et al., 2011).

Os resultados para Fosfatase Alcalina (FA) mostram que houve uma queda nos níveis séricos desta enzima no Grupo Controle, o que segundo Gilbert et al. pode ser devido à diminuição da FA óssea no ligamento periodontal, pelo qual uma redução poderia ser esperado nos níveis séricos desta enzima (GILBERT et al., 2003), demonstrando uma relação positiva para doença periodontal em razão dessa circunstância patológica (PERUMAL et al., 2014).

Na análise dos diferentes Grupos A-14%, A-25% e A-36% observou-se que estes apresentaram diferenças estatísticas com menor nível de FA quando comparado ao Grupo Controle, o que indicaria que houve uma diminuição da síntese hepática da FA por dano hepatocelular com colestase consequente da frequência (TEZAL et al., 2001) e consumo do álcool (ACHARYA et al., 2001). No entanto, outros estudos tem mostrado que níveis séricos da FA não se apresentam tão elevados em pacientes com hepatite alcoólica como em outras condições (SCHLAEGER et al., 1982; REICHLING; KAPLAN, 1988), o que explicaria a singularidade de que os níveis não se apresentem tão elevados nos picos máximos dos Grupos A-14%, A-25% e A-36% quanto comparados ao Baseline.

Outro fator importante que poderia ser atribuído na queda do nível de FA encontrado no plasma dos animais alcoolizados, é à diminuição no metabolismo da absorção da gordura dietética causado pela interação do etanol com o fígado, devido a que os ácidos graxos se acumulam no fígado, assim, o etanol afeta o transporte desses ácidos para o intestino (BLOMSTRAND et al., 1973; LIEBER, 1973).

Jaiswal et al., em 2011, compararam os níveis de FA em pacientes com cirrose com e sem periodontite e correlacionaram os níveis de FA com a severidade da periodontite, e concluíram que há uma forte correlação positiva entre a destruição periodontal e o nível da FA sérica em pacientes com cirrose hepática, sendo um reflexo do estado de inflamação local dos tecidos periodontais (DALTABAN et al., 2006).

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, Bezerra 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).

Portando, 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. Broulík 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 e Rocha (2009), 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 (KHOCHT et al., 2003; SOUZA; ROCHA, 2011; TEZAL et al. 2001), 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 FAPESP, processo nº 2013/18560-2.

Referências

- ACHARYA, S. et al. A subtoxic interactive toxicity study of ethanol and chromium in male Wistar rats. **Alcohol**, v.23, n.2, p.99-108, 2001.
- 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, Araçatuba, 2013.
- AMARAL, S. et al. 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.320-330, 1989.
- BEZERRA 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, Taubaté, 2006.
- BLOMSTRAND, R.; KAGER, L.; LANTTO, O. Studies on the ethanol-induced decrease of fatty acid oxidation in rat and human liver slices. **Life Sci.**, v. 13, n. 8, p. 1131-1141, 1973.
- 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.**, v. 26, n. 3, p. 190-198, 1999.

CHAVASSIEUX, P. et al. 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. et al. A practical method of chronic ethanol administration in mice. **Methods Mol. Biol.**, v.447, p.49-59, 2008.

CUI, Q. et al. Alcohol-induced adipogenesis in a cloned bone-marrow stem cell. **J. Bone Joint Surg. Am.**, v. 88, sup. 3, p. 148-154, 2006.

DALTABAN, O. et al. Gingival crevicular fluid alkaline phosphatase levels in postmenopausal women: effects of phase I periodontal treatment. **J. Periodontol.**, v. 77, n. 1, p. 67-72, 2006.

DANTAS, A. M. et al. Ethanol consumption enhances periodontal inflammatory markers in rats. **Arch Oral Biol.**, v.57, n.9, p.1211-1217, 2012.

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. et al. Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. **Dev. Biol.**, v.122, n.1, p.49-60, 1987.

GILBERT, P. et al. Alkaline phosphatase isoenzyme activity in serum from patients with chronic periodontitis. **J. Periodont.**, v.38, p.362-365, 2003.

GOES, P. et al. 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.

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.

JAISWAL, G. et al. Serum alkaline phosphatase: A potential marker in the progression of periodontal disease in cirrhosis patients. **Quintessence Int.**, v.42, n.4, p.345-348, 2011.

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.

KORNMAN, K. S.; PAGE, R. C.; TONETTI, M. S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. **Periodontol.** 2000, v. 14, p. 33-53, 1997.

LAITINEN, K.; VÄLIMÄKI, M. Alcohol and bone. **Calcif. Tissue Int.**, v.49, Suppl, p. S70-S73, 1991.

LARATO, D. C. Oral tissue changes in the chronic alcoholic. **J. Periodontol.**, v.43, n.12, p.772-773, 1972.

LIEBER, C. S. Hepatic and metabolic effects of alcohol (1966 to 1973). **Gastroenterology**, v. 65, n. 5, p. 821-846, 1973.

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. 4-nitrophenyl phosphate--characterization of high-purity materials for measuring alkaline phosphatase activity in human serum. **Clin. Chem.**, v.27, p.135-143, 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.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **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.

PERUMAL, G. C. L. et al. Serum tissue non specific alkaline phosphatase isoenzyme level and severity of chronic periodontitis. **Ind. J. Sci. Technol.**, v.7, n. 10, p. 551-1554, 2014.

REHM, J.; PARRY, C. Alcohol consumption and infectious diseases in South Africa. **Lancet**, v. 374, n. 9707, p. 2053, 2009.

REICHLING, J. J.; KAPLAN, M. M. Clinical use of serum enzymes in liver disease. **Dig. Dis. Sci.**, v. 33, n.12, p. 1601-1614, 1988.

ROMEO, J.; WÄRNBERG, J.; MARCOS, A. Drinking pattern and socio-cultural aspects on immune response: an overview. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 69, n. 3, p. 341-346, 2010.

ROSKOSKI JÚNIOR, R. **Biochemistry.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SALERNO, J. A.; WALTENBAUGH, C.; CIANCIOTTO, 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.

SCHLAEGER, R.; HAUX, P.; KATTERMANN, R. Studies on the mechanism of the increase in serum alkaline phosphatase activity in cholestasis: significance of the hepatic bile acid concentration for the leakage of alkaline phosphatase from rat liver. **Enzyme**, n. 1, p. 3-13, 1982.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SLOVIK, R. M. et al. Clinical evaluation of bone turnover by serum osteocalcin measurements. **J. Clin. Invest.**, v.59, p.228-230, 1984.

SOUZA, D. M.; ROCHA, R. F. Associação entre ingestão de álcool e periodontite experimental em ratas fêmeas, 2011. **Rev. AMRIGS**, v.55, n.4, p.315-319, 2011.

SOUZA, D. M.; ROCHA, R. F. Low caloric value of ethanol itself increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in male rats. **Braz. Oral Res.**, v. 23, n. 4, p. 460-466, 2009.

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.**, v.38, n.7, p.2001-2007, 2014.

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.367-36, 2007.

TEZAL, M. et al. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. **J. Periodontol.**, 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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The classification of mental and behavioral disorders**: clinical descriptions and diagnostic guidelines. Geneva: World Health Organization, 1992.

Anexos

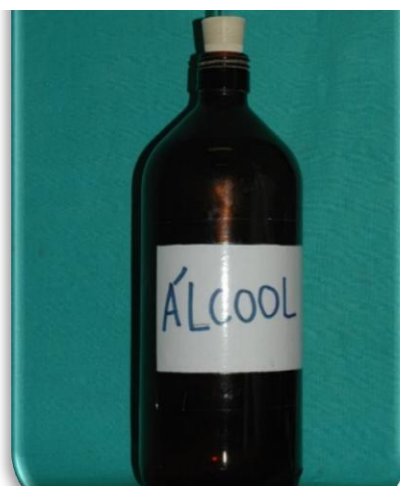
Anexo A – Figuras

Figura 2 - Frascos de Xilazina (6mg/Kg) e Quetamina (70 mg/Kg).



Fonte: Do Autor

Figura 3 - Solução Alcoólica Acondicionada em Bebedouro



Fonte: Do Autor

Figura 4 - Indução da Periodontite Experimental



Fonte: Do Autor

Figura 5 - Punção Cardíaca



Fonte: Do Autor

Figura 6 - Frasco com gel separador



Fonte: Do Autor

Figura 7 - Centrífuga



Fonte: Do Autor

Figura 8 - Kit da Fosfatase Alcalina

Fonte: Do Autor

Figura 9 – Espectrofotômetro

Fonte: Do Autor

Anexo B – 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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Mary Marcondes".

Prof. Dra. MARY MARCONDES
Vice-Coordenadora da CEUA