UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Faculdade de Odontologia

ADRIANA MATHIAS PEREIRA DA SILVA MARCHINI

INFLUÊNCIA DO ALCOOLISMO CRÔNICO E DA DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA SOBRE A VARIAÇÃO DE ESTEQUIOMETRIA DA HIDROXIAPATITA NA CRISTA ÓSSEA ALVEOLAR DE RATAS

2010

ADRIANA MATHIAS PEREIRA DA SILVA MARCHINI

INFLUÊNCIA DO ALCOOLISMO CRÔNICO E DA DEFICIÊNCIA ESTROGÊNICA SOBRE A VARIAÇÃO DE ESTEQUIOMETRIA DA HIDROXIAPATITA NA CRISTA ÓSSEA ALVEOLAR DE RATAS

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha
Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Maria do Espírito Santo

São José dos Campos
2010

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

M332i Marchini, Adriana Mathias Pereira da Silva.
Influência do alcoolismo crônico e da deficiência estrogênica sobre a variação de estequiometria da hidroxiapatita na crista óssea alveolar de ratas / Adriana Mathias Pereira da Silva Marchini. __ São José dos Campos : [s.n.], 2010
94 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2010.
Orientador: Profa. Dra. Rosilene Fernandes da Rocha
Co-orientador: Profa Dra. Ana Maria do Espírito Santo

1. Alcoolismo. 2. Ovariectomia. 3. Osteoporose. 4. Periodonto. 5. Espectrometria de fluorescência. 6. Cálcio. 7. Fósforo. I. Rocha, Rosilene Fernandes da. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título

tD64

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

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 03 de agosto de 2010.
Assinatura:
E-mail: adrimarchini@directnet.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha (Orientadora)
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Profa. Dra. Emilia Angela Loschiavo Arisawa
Faculdade de Ciências da Saúde
Universidade do Vale do Paraíba - UNIVAP

Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvallho
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

São José dos Campos 03 de agosto de 2010.

DEDICATÓRIA

*Ao meu esposo, **LEONARDO**, pai e companheiro amoroso, por ter me incentivado a percorrer este caminho. Obrigada pelo apoio e incentivo na minha realização pessoal e profissional. Amo você a cada dia mais!*

*Aos meus queridos filhos **DANIEL** e **GABRIEL**, os maiores tesouros da minha vida, pelas muitas horas de atenção e carinho que não lhes pude dedicar para poder iniciar e concluir este trabalho. Amo muito vocês!*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **DEUS** pelo dom da vida e por ter me dado força e saúde para que eu pudesse concluir com êxito este trabalho.

À minha orientadora, Profª. Adj. **ROSILENE FERNANDES DA ROCHA,** que me recebeu de braços abertos no Programa de Pós-Graduação e auxiliou-me em todas as fases de elaboração desta dissertação, sempre com muito carinho dedicação e competência.

À minha co-orientadora, Profª Dra. **ANA MARIA DO ESPÍRITO SANTO**, pela paciência e colaboração durante as fases laboratoriais e análises estatísticas, sem a qual a elaboração deste trabalho seria impossível.

À minha mãe, **MÁRCIA,** pelo grande incentivo para que eu entrasse no Programa de Pós-Graduação. Agradeço, também, por ter ajudado a cuidar de meus filhos enquanto escrevia esta dissertação. Seu apoio direto e indireto foi essencial para que eu obtivesse esta vitória. Amo muito você!

Ao meu pai, **ARTHUR,** que durante muito tempo financiou os meus estudos para que eu tivesse condições de, a

partir da graduação, continuá-los em uma Universidade de excelência. Obrigada por seu apoio e auxílio em todos os momentos acreditando no meu potencial.

Aos meus avós, **ANTÔNIO** e **MARIA APARECIDA,** pelo amor, carinho e incentivo para que eu pudesse realizar-me como pessoa e profissional. Vocês são um grande exemplo de vida!

Ao meu irmão, **ARTHUR**, minha cunhada, **DALVA**, e a todos os meus tios e primos, pois acredito que ter tido uma família amorosa e unida foi muito importante para realização de meus sonhos e conquistas.

À minha sogra, **MARIA AMÉLIA,** meu sogro, **NORBERTO**, e minha cunhada, **LARISSA,** que ajudaram a cuidar de meus preciosos filhos para que eu pudesse elaborar este estudo. Obrigada também por me tratarem como filha e irmã. Vocês são pessoas maravilhosas!

Aos avós, tios e primos de meu esposo que sempre me trataram com grande carinho e pelos quais tenho enorme respeito e admiração.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de São José dos Campos da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", representada pelo seu diretor Prof. Adj. **JOSÉ ROBERTO RODRIGUES**, por possibilitar a realização deste trabalho.

À **COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES)** pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal na pessoa da coordenadora Profª Adj. **CRISTIANE YUMI KOGA-ITO.**

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal em especial à Profª. Tit. **YASMIN RODARTE CARVALHO** e a Profª. Dra. **ADRIANA AIGOTTI H. BRANDÃO** pelas sugestões e auxílios necessários durante a elaboração desta dissertação.

Às jovens doutoras **GISELLE SEGNINI SENRA, JULIANA MADUREIRA DE SOUZA LIMA ALONSO** e **RENATA FALCHETE DO PRADO** que me auxiliaram com preciosas sugestões.

À amiga e colega do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, **CAMILA PORTO DE DECO**, com a qual pude contar sempre que precisei. Agradeço também pelo seu auxílio direto, especialmente durante as fases iniciais de elaboração deste trabalho.

À amiga e colega do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, **KARINA BORTOLIN LODI**, que compartilhou comigo seus animais de laboratório e auxiliou durante as análises dos resultados.

Aos demais colegas do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, grandes amigos, cujo apoio e cumplicidade foram essenciais para realização deste trabalho.

Às estagiárias, **LUCIANA CÉLIA CAMPOS** e **MIRIANE CARNEIRO MACHADO**, que têm prestado importante auxílio na elaboração de um novo projeto de pesquisa, o qual certamente ajudará a elucidar melhor muitos dos resultados obtidos nesta dissertação.

À aluna de graduação **LUCÉLIA LEMES GONÇALVES**, grande amiga, que colaborou durante a preparação das amostras.

Aos alunos de iniciação científica e estagiários que colaboraram durante o tratamento e cirurgia dos animais.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal **ROSEMARY DE FÁTIMA SALGADO, ERENA MICHIE HASEGAWA** *e* **MARIA APARECIDA CONSIGLIO DE SOUZA** *pela atenção e disponibilidade.*

À **SILVANA ALVAREZ** *e* **RENATA APARECIDA DE OLIVEIRA COUTO** *pela paciência na revisão da formatação deste estudo.*

Aos funcionários do Biotério **LOURIVAL JACOBS, ANTÔNIO DOMINGOS SÁVIO BARBOSA MAIA VASCONCELLOS** *e* **MARCO ANTÔNIO CORRÊA ALFREDO** *pela colaboração durante os procedimentos de experimentação animal.*

"O princípio da sabedoria é: adquire a sabedoria; sim com tudo que possuís adquire o entendimento. Estima-a, e ela te exaltará; se a abraçares, ela te honrará; dará à tua cabeça um diadema de graça, e uma coroa de glória te entregará"

Provérbios de Salomão 4.7-9

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... 12
RESUMO..... 14
1 INTRODUÇÃO..... 15
2 REVISÃO DA LITERATURA..... 17
2.1 Deficiência estrogênica, consumo excessivo de álcool e seus efeitos sobre os ossos..... 17
2.2 Deficiência estrogênica, consumo moderado de álcool e seus efeitos sobre os ossos..... 23
2.3 Relação entre alcoolismo, nutrição e qualidade óssea..... 26
2.4 Deficiência estrogênica, álcool e alterações periodontais..... 27
2.5 Relação entre alterações nutricionais e doença periodontal..... 31
2.6 O padrão de mineralização óssea e a análise por espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva..... 33
3 PROPOSIÇÃO..... 38
4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 39
4.1 Animais..... 39
4.1.1 Grupos experimentais..... 39
4.1.2 Dieta dos animais..... 40
4.2 Procedimentos Cirúrgicos..... 42
4.2.1 Anestesia..... 42
4.2.2 Ovariectomia e cirurgia Sham..... 43
4.2.3 Sacrifício..... 44
4.2.4 Cronograma de procedimentos..... 44
4.3 Avaliações de alterações de peso corpóreo e padrão de consumo dietético..... 45

4.3.1 Peso corpóreo..... 45
4.3.2 Padrão de consumo dietético..... 45
4.4 Preparo das amostras..... 46
4.5 Microespectrometria de fluorescência de raios-X..... 49
4.5.1 Análise semiquantitativa em linha..... 52
4.5.2 Análise descritiva..... 54
4.5.3 Colaborações..... 54
4.6 Análise estatística..... 54
5 RESULTADOS..... 56
5.1 Variações no número de amostras por grupo..... 56
5.2 Alterações no peso dos animais..... 57
5.3 Variações na ingestão de ração..... 59
5.4 Variações na ingestão de líquidos..... 60
5.5 Cálculo da média de álcool ingerida por kg de peso/dia..... 61
5.6 Análise descritiva das amostras após a padronização da escala de cores..... 62
5.7 Análise semiquantitativa dos dados obtidos pela espectrometria 64
5.7.1 Análise das concentrações de Ca em porcentagem de peso..... 64
5.7.2 Análise das concentrações de P em porcentagem de peso..... 66
5.7.3 Análise da relação Ca/P..... 68
6 DISCUSSÃO..... 71
7 CONCLUSÃO..... 79
8 REFERÊNCIAS..... 80
ANEXO..... 93
ABSTRACT..... 94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C = Grau Célsius

Ca = Cálcio

Ca/P = Relação cálcio/fósforo

$Ca_{10}(PO_4)_6OH_2$ = Hidroxiapatita

CV% = Coeficiente de variação em porcentagem

Fluid oz = Fluid ounce (unidade de volume que equivale a cerca de 29,57 mililitros)

g/kg = Gramas por quilograma

g/ml = Gramas por mililitro

H = Hidrogênio

IC = Intervalo de confiança

IL-1 = Interleucina 1

IL1-β = Interleucina 1-beta

IL-6 = Interleucina-6

kcal/g = Quilocalorias por grama

kV = Quilovolts

Li = Lítio

Max = Máximo

mg/Kg = Miligrama por quilograma

Min = Mínimo

mm = Milímetro

mM = Milimolar

N = Tamanho da amostra

O = Oxigênio

OPG = Osteoprotegerina

Ovz = Ovariectomia

Ovz álcool = Ovariectomia associada à ingestão de solução alcoólica 20%

Ovz iso = Ovariectomia associada à dieta isocalórica

Ovz livre = Ovariectomia associada à dieta livre (água e ração à vontade)

P = Fósforo

Q1 = 1º quartil

Q3 = 3° quartil

RANK = Receptor ativador de fator nuclear Kappa B

RANKL = Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B

Sham = Ovariectomia simulada

Sham álcool = Ovariectomia simulada associada à ingestão de solução alcoólica 20%

Sham iso = Ovariectomia simulada associada à dieta isocalórica

Sham livre = Ovariectomia simulada associada à dieta livre (água e ração à vontade)

Si = Silício

TNF-α = Fator de necrose tumoral alfa

v/v = Volume/volume

µEDX = Espectrômetro de microfluorescência de raios-X por energia dispersiva

Marchini AMPS. Influência do alcoolismo crônico e da deficiência estrogênica sobre a variação de estequiometria da hidroxiapatita na crista óssea alveolar de ratas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2010.

RESUMO

Os ossos são compostos por um tipo mineralizado de tecido conjuntivo, constituído principalmente pelos elementos químicos cálcio (Ca) e fósforo (P) que se organizam formando cristais de hidroxiapatita. Patologias ou condições que afetem o tecido podem alterar a quantificação destes elementos e consequentemente a composição estequiométrica da hidroxiapatita. Estudos recentes sugerem que, tanto o alcoolismo crônico, quanto a deficiência estrogênica, podem afetar os ossos em geral, inclusive o osso alveolar, e aumentar a suscetibilidade do indivíduo à progressão da doença periodontal. O principal objetivo deste trabalho foi verificar possíveis alterações na relação Ca/P, na região da crista óssea alveolar, em ratas submetidas ao alcoolismo crônico e/ou a deficiência estrogênica induzida por ovariectomia. Cinquenta e quatro ratas, (*Rattus norvegicus*, variação *albinus, Wistar*), foram inicialmente divididas em dois grupos: ovariectomizadas (Ovz) ou Sham operadas. Um mês após as cirurgias, os grupos foram subdivididos, de acordo com a dieta, e receberam os seguintes tratamentos: a) álcool a 20% b) dieta isocalórica e c) dieta livre. Oito semanas depois do início do tratamento dietético, os animais foram sacrificados e as mandíbulas removidas. As amostras foram cortadas no sentido longitudinal, na região da crista óssea alveolar, entre o primeiro e o segundo molar, para verificação das concentrações de Ca, P e da relação Ca/P mediante a utilização de um espectrofotômetro de microfluorescência de raios-X (EDX). Os dados obtidos pela espectrometria foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de significância de 5%. Os grupos com dieta livre apresentaram os maiores valores médios na relação Ca/P, e os com controle dietético, os menores. O grupo Ovz dieta livre foi o que mais ganhou peso, mais consumiu ração e que apresentou maiores valores na relação Ca/P (média de 2,03 ± 0,04). No entanto, estes valores não foram considerados estatisticamente diferentes ($p>0,05$) do Sham dieta livre (média de 2,01 ± 0,01). O grupo Ovz álcool foi o que apresentou os menores valores na relação Ca/P (média de 1,92 ± 0,06), sendo o único estatisticamente diferente ($p<0,001$) do Sham dieta livre. Conclui-se que a ovariectomia associada ao consumo de álcool a 20% alterou significativamente a estequiometria da hidroxiapatita, levando a uma diminuição nos valores da relação Ca/P.

Palavras-chave: Alcoolismo. Ovariectomia. Osteoporose. Periodonto. Espectrometria de fluorescência. Cálcio. Fósforo.

1 INTRODUÇÃO

Os ossos são compostos por um tipo mineralizado de tecido conjuntivo cujos principais elementos químicos constituintes são o cálcio (Ca) e o fósforo (P), que se organizam formando cristais de hidroxiapatita (Clarke, 2008). Condições fisiológicas, patológicas ou ligadas ao estilo de vida, que porventura afetem o tecido, podem alterar a concentrações destes elementos e consequentemente a estequiometria da hidroxiapatita (Zaichick; Tzaphlidou, 2003; Tzaphlidou et al., 2006; Moe, 2008). Ainda são poucos os estudos que se propõem a verificar o padrão de distribuição do Ca e P no tecido ósseo. No entanto, novas pesquisas nesta área poderiam ajudar a entender melhor o padrão de mineralização óssea e a sua relação com determinadas doenças, como por exemplo, a osteoporose (Fountos et al., 1999; Zaichick; Tzaphlidou, 2003; Tzaphlidou et al., 2006).

A osteoporose é uma importante desordem óssea metabólica, cujo fator etiológico mais frequente é a deficiência estrogênica, que ocorre principalmente em mulheres após a menopausa (Pereira; Mendonça, 2006). Esta condição gera alterações no padrão de remodelação óssea, com predomínio do processo de reabsorção, o que pode alterar a homeostase do Ca e P e diminuir a densidade mineral óssea (Meunier; Boivin, 1997; Boivin; Meunier, 2003; Moe, 2008). Apesar da importância da deficiência estrogênica na etiologia da osteoporose, esta é uma doença multifatorial, que envolve vários outros fatores de risco, entre eles o consumo excessivo de álcool (Templeton, 2005; Pereira; Mendonça, 2006).

A doença periodontal é uma alteração imuno inflamatória que afeta as estruturas que suportam os dentes, cujo fator etiológico

primário é a placa bacteriana, mas que pode ser modulada por fatores sistêmicos, que alteram a maneira pela qual o hospedeiro reage ao agente agressor (Taubman et al., 2005; Kim; Amar, 2006; Alonso, 2009; Pizzo et al., 2009). Os efeitos da deficiência estrogênica e do consumo excessivo de álcool sobre a qualidade óssea são mais claramente compreendidos e estudados em ossos longos, no entanto, alguns pesquisadores sugerem que, tais condições, também possam afetar o osso alveolar e aumentar a suscetibilidade do hospedeiro à progressão da doença periodontal (Dervis, 2005; Amaral et al., 2008; Irie et al., 2008; Kuo et al., 2008).

Apesar da importância do Ca e P como principais constituintes da fase mineral óssea e das possíveis implicações da deficiência estrogênica e do consumo excessivo de álcool sobre o desenvolvimento da doença periodontal, na revisão de literatura deste trabalho, não foram encontradas pesquisas que se propusessem a avaliar as concentrações destes elementos químicos, especificamente na região da crista óssea alveolar, uma estrutura cuja integridade é importante para a manutenção da saúde do periodonto.

Levando em consideração estudos prévios realizados nos laboratórios da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP (Alonso, 2009; Deco, 2009), a hipótese deste trabalho é de que a ovariectomia, associada ao consumo de álcool, possa influenciar negativamente a qualidade do osso alveolar e, possivelmente, alterar sua composição química mineral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Deficiência estrogênica, consumo excessivo de álcool e seus efeitos sobre os ossos.

A osteoporose, uma doença cujo fator etiológico mais comum é a deficiência estrogênica que ocorre após a menopausa, é uma desordem esquelética crônica, caracterizada por um comprometimento da resistência óssea, cujo tratamento pode ter custos elevados, especialmente relacionados à maior predisposição dos indivíduos a diversos tipos de fraturas, o que pode gerar um aumento da morbidade e mortalidade (Pereira; Mendonça, 2006; Boonen; Singer, 2008; Cole et al., 2008). Embora a osteoporose seja considerada a doença óssea metabólica mais comum, o número de estudos sobre a prevalência no Brasil ainda é pequeno (Frazão; Naveira, 2006). Por outro lado, uma pesquisa desenvolvida pela *National Osteoporosis Foundation*, nos Estados Unidos, estima que, em 2002, cerca de 10 milhões de americanos com 50 anos de idade ou mais já tenham sido afetados pela doença, sendo quase 80% deste grupo composto por mulheres. Estima-se ainda que, se esforços não forem feitos no sentido de controlar o problema, estes números podem chegar a aproximadamente 14 milhões em 2020 (National Osteoporosis Foundation, 2010).

O consumo excessivo de álcool também é um importante problema de saúde pública que contribui fortemente para etiologia e manutenção de vários problemas sociais e econômicos encontrados no Brasil (Galduróz; Caetano, 2004). Carlini et al. (2006) através de um levantamento epidemiológico envolvendo 108 cidades brasileiras

concluíram que a prevalência de entrevistados classificados como dependentes do álcool, no ano de 2005, alcançou 12,3% da amostra. Em, 2001 a prevalência obtida em um estudo semelhante havia sido de 11,2%. De acordo com este trabalho, ter-se-ia, em 2005, aproximadamente 6.268.000 pessoas dependentes do álcool (Carlini et al., 2002; Carlini et al., 2006).

Estes dados epidemiológicos ressaltam a importância de conhecer, mais profundamente, os efeitos da deficiência estrogênica e do consumo excessivo de álcool, assim como suas possíveis implicações na saúde da população.

O estrógeno é um hormônio regulador do metabolismo ósseo cujo principal mecanismo de ação está relacionado à diminuição da formação e sobrevivência de osteoclastos. No entanto, também é capaz de estimular a formação óssea, agindo em receptores presentes nos osteoblastos (Faloni; Cerri, 2007).

A diminuição da formação de osteoclastos ocorre principalmente devido a atuação do estrógeno na via RANK/RANKL/OPG (receptor ativador de fator nuclear Kappa B / ligante de RANK / osteoprotegerina). Inicialmente o estrógeno atua sobre células osteoprogenitoras (da linhagem osteoblástica) levando à diminuição dos níveis de RANKL e aumento de OPG. Esta última compete com o RANKL ligando-se ao mesmo e tornando-o menos disponível. Células precursoras de osteoclastos têm em suas superfícies receptores para RANK e a ligação entre RANK e RANKL estimula o processo de formação de osteoclastos. No entanto, na presença do estrógeno, as taxas de RANKL disponíveis diminuem o que inibe a formação osteoclástica e consequentemente a reabsorção óssea (Faloni; Cerri, 2007; Horner, 2009).

Além da ação sobre a via RANK/RANKL/OPG o estrógeno atua sobre células T e monócitos diminuindo a expressão de importantes citocinas estimuladoras da atividade osteoclástica tais como

TNF-α (fator de necrose tumoral alfa), IL-1 (interleucina-1) e IL-6 (interleucina-6) (Lerner, 2006; Faloni; Cerri, 2007). A presença deste hormônio, também interfere na sobrevivência de osteoclastos favorecendo a morte destas células por apoptose, o que contribui, de maneira adicional, para a inibição dos processos de reabsorção óssea (Faloni; Cerri, 2007; Folkestad et al., 2009; Horner, 2009).

Os mecanismos do efeito estimulatório do estrogênio sobre o processo de formação óssea são menos compreendidos. No entanto, acredita-se que este hormônio tenha um efeito regulador sobre a atividade osteoblástica, já que receptores de estrogênio encontrados em osteoblastos têm sido relacionados à expressão de genes envolvidos na síntese da matriz óssea (Lerner, 2006; Faloni; Cerri, 2007).

Se por um lado, a presença de estrógeno atua diminuindo a formação e a de sobrevivência de osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea, a deficiência estrogênica estimula este processo. A atividade coordenada entre osteoblastos formadores de osso e osteoclastos que o reabsorvem é um processo denominado remodelação óssea, que é importante não apenas para a manutenção da massa óssea, mas também na reparação de microdanos, na prevenção do acúmulo de osso envelhecido e na homeostase mineral. Tem sido sugerido que na deficiência estrogênica há uma elevação das taxas de remodelação óssea, caracterizada por um aumento tanto do número de osteoclastos, quanto do número de osteoblastos, no entanto, há um decréscimo na habilidade individual dos osteoblastos para produzirem novo osso, o que causa um desproporcional aumento da reabsorção em relação à formação óssea (Lerner, 2006).

A diminuição da densidade mineral óssea induzida pelo consumo excessivo de álcool parece ser diferente daquela que ocorre na osteoporose após a menopausa. Estudos com humanos, animais e culturas de células sugerem que o excesso de álcool provoque um efeito tóxico dependente na atividade osteoblástica com poucas interferências

na atividade osteoclástica. Desta forma, nova formação de osso é suprimida enquanto pequenas mudanças ocorrem na reabsorção (Turner, 2000; Chakkalakal, 2005).

Além do efeito direto do uso abusivo do álcool sobre as células ósseas é possível que seu uso crônico possa também interferir, indiretamente, na regulação de outras substâncias que alteram o metabolismo do tecido, tais como, a vitamina D, hormônios da paratireóide e a calcitonina. Tais alterações poderiam ser consideradas fatores adicionais para instalação da osteopenia ou osteoporose relacionada ao abuso do álcool (Sampson, 1997).

Rocha (2005) avaliou o efeito do consumo crônico de álcool no fêmur de ratos machos e fêmeas. Para tanto, os animais foram divididos, por gênero, em sete grupos com cinco animais cada. Os grupos foram: controle, que recebeu água e ração à vontade; álcool, que recebeu álcool nas concentrações de 10, 20 e 30% (v/v) diluído na água oferecida para beber; e isocalórico, cuja dieta era adaptada afim de que os animais ingerissem a mesma quantidade de calorias dos grupos que receberam álcool. Após oito semanas de dieta os animais foram sacrificados e os fêmures avaliados. A autora observou que a espessura da cortical, tanto nos machos como nas fêmeas, não foi alterada. No entanto, a porcentagem de osso trabeculado diminuiu tanto nas fêmeas ingerindo álcool a 30% quanto nas três concentrações alcoólicas nos machos e que a densidade óptica apresentou-se reduzida somente nas concentrações de 30% tanto nos machos como nas fêmeas. Por outro lado, deve-se salientar que, neste estudo, a autora teve dificuldades de trabalhar com animais ingerindo álcool 30%, já que muitos deles acabaram morrendo antes do final do experimento, provavelmente devido às altas doses de álcool administradas.

Hogan et al. (2001) avaliaram, em ratas de nove meses, o efeito da dieta alcoólica, durante oito e quatorze semanas, nas quais os animais não recebiam álcool diluído na água de beber e sim na forma de

um líquido dietético, adequado nutricionalmente, contendo etanol (8.1% v/v; método de Lieber-DeCarli). Foram feitas análises morfológicas, histomorfométricas e testes biomecânicos para avaliar a qualidade óssea na tíbia e fêmur dos animais. O estudo demonstrou que o consumo crônico de álcool levou a uma diminuição significativa nas propriedades do osso medular e que estes efeitos dependeram da duração de uso do álcool, sendo mais significativos nos ratos que receberam álcool por 14 semanas.

Callaci et al. (2006) estudaram os efeitos de altas concentrações sanguíneas de álcool (simulando os efeitos do álcool em indivíduos alcoólatras ou após uma bebedeira) sobre as vértebras de ratas ovariectomizadas associados ao tratamento com hormônio da paratireóide. Noventa e seis ratas adultas (400 g), divididas em dois grupos com quarenta e oito animais cada, foram submetidas à ovariectomia bilateral ou cirurgia Sham. Um mês após a cirurgia os animais foram divididos em quatro grupos e tratados por duas a quatro semanas. O primeiro grupo recebeu uma solução fisiológica, o segundo foi tratado com solução alcoólica a 20% (3 g/kg de peso, via intraperitoneal, três vezes por semana), o terceiro recebeu tratamento com paratormônio e o último grupo recebeu uma associação do hormônio com o álcool. Após o tratamento, coletou-se o sangue dos animais para a mensuração da concentração de álcool e as vértebras foram removidas para verificação do nível de densidade óssea mineral, avaliação da microarquitetura trabecular e análise da resistência vertebral à compressão. Os autores concluíram que o tratamento com álcool causou significativa perda óssea vertebral adicional nas ratas ovariectomizadas e que os efeitos do álcool e da deficiência estrogênica poderiam ser compensados pelo tratamento com o paratormônio.

Rosa et al. (2008) investigaram se o consumo crônico de etanol seguido pela subsequente exposição ao etanol em cultura de células afetava a diferenciação osteoblástica. Oito ratos adultos foram

tratados com etanol ou água (controle). Os animais receberam etanol de 5 a 20% (v/v) (0,85-3,45mM) na água de beber. A concentração do etanol foi sendo aumentada em 5 % por semana, durante um período de quatro semanas, até que a concentração a 20% fosse alcançada. O álcool a 20% foi mantido por um período de quinze dias. Células tronco da medula óssea, obtidas do fêmur dos animais controle e tratado, foram cultivadas e a elas foi dada suplementação ou não de etanol. A morfologia celular, proliferação e viabilidade, conteúdo proteico total, atividade da fosfatase alcalina e formação de nódulos semelhantes ao osso foram avaliados. Os autores observaram que o etanol afetava diretamente a função dos osteoblastos, inibindo o processo de mineralização da matriz óssea, o que pode ser verificado por uma diminuição na formação de nódulos semelhantes ao osso nos grupos tratados com etanol.

Callaci et al. (2009) observaram, em ratos machos, os efeitos da administração intraperitoneal de álcool (3g/kg), durante três dias consecutivos semanais, por uma ou quatro semanas (para simular os efeitos de altas doses de álcool administradas de forma aguda ou crônica). Após quatro semanas de tratamento, houve uma significativa diminuição da densidade óssea mineral medular, avaliada por tomografia computadorizada quantitativa, e um decréscimo da resistência a testes de compressão. Neste estudo, os autores também verificaram, mediante a utilização de técnicas de biologia molecular, que as expressões de vários genes importantes para os processos de formação e reabsorção óssea, ficaram significativamente perturbadas pelo tratamento com álcool.

Alvisa-Negrín et al. (2009) verificaram, em humanos, que o consumo elevado de álcool é prejudicial ao tecido ósseo. Os autores observaram os efeitos do alcoolismo e da abstinência sobre a qualidade óssea, utilizando variados parâmetros de avaliação, tais como, densitometria óssea em diversos sítios e análises bioquímicas de marcadores da remodelação óssea. O estudo mostrou, claramente, que o consumo excessivo de álcool prejudica a qualidade óssea e que a

abstinência, associada a mudanças no estilo de vida, pode melhorar os parâmetros avaliados.

É importante ressaltar que apesar da maioria das pesquisas indicarem que o consumo crônico e elevado de álcool está relacionado à perda da qualidade óssea, ainda existem alguns estudos conflitantes

Kidder e Turner (1998) trabalharam com ratas adultas de seis meses de idade, ovariectomizadas ou Sham operadas, submetidas à dieta alcoólica. Os animais receberam uma dieta líquida modificada (Lieber-DeCarli) suplementada isocaloricamente com maltose/dextrano ou contendo 13 e 35% do total de calorias derivadas do álcool por dois meses. Neste estudo, a ovariectomia aumentou significativamente os índices de remodelação óssea resultando em perda de osso trabecular, mas o consumo de álcool não causou efeitos adicionais prejudiciais significativos. Os pesquisadores realçaram o fato de terem utilizado animais de seis meses de idade, um modelo que, segundo eles, simularia a idade de uma mulher após a menopausa. Isto porque, outros estudos têm mostrado que os efeitos prejudiciais sobre a qualidade óssea parecem ser maiores em indivíduos ou animais mais jovens, especialmente naqueles em fase de crescimento, que ainda não passaram pelo período de maturação óssea (Chakkalakal, 2005).

2.2 Deficiência estrogênica, consumo moderado de álcool e seus efeitos sobre os ossos.

Se por um lado, a maioria das evidências mostra que o consumo excessivo de álcool está relacionado a um maior risco de fraturas osteoporóticas e perda de qualidade óssea, por outro, pesquisas

recentes indicam que o consumo moderado parece ter efeitos benéficos sobre a densidade mineral óssea (Berg et al., 2008).

Berg et al. (2008), em revisão de literatura, observaram que, comparando-se com a abstinência, pessoas que consomem uma dose ou menos de álcool por dia, parecem ter menor risco de fraturas de quadril e que o consumo de mais de duas doses de álcool por dia está associado a um maior risco para este tipo de fratura. Os autores consideraram que uma dose padrão seria equivalente a 14 g de álcool puro ou 0,6 fluid oz.

Os efeitos precisos do moderado consumo de álcool sobre o metabolismo ósseo ainda permanecem desconhecidos, mas acredita-se que isto possa estar relacionado a alterações hormonais indiretas a longo prazo (Berg et al., 2008). Dentro desta linha de pesquisa, alguns autores têm sugerido que o consumo moderado de álcool poderia ter efeito protetor sobre a perda óssea após a menopausa (Purohit, 1998; Macdonald et al., 2004; Epstein et al., 2007; Berg et al., 2008). No entanto, este efeito parece deixar de ocorrer quando o consumo de álcool é elevado (Callaci et al., 2006; Epstein et al., 2007). Essa associação é ainda mais evidente em mulheres que fazem uso moderado de álcool juntamente com terapia para reposição hormonal e pode estar relacionada com níveis elevados de estradiol circulante (Ginsburg et al., 1996; Purohit, 1998).

Ginsburg et al. (1996) verificaram se o consumo moderado de álcool aumentava os níveis de estradiol na circulação em mulheres após a menopausa que estavam recebendo ou não terapia para reposição hormonal. Os autores verificaram que o álcool não modificou de forma significativa os níveis de estradiol nas mulheres do grupo controle (que não receberam terapia para reposição hormonal). Por outro lado, a ingestão de álcool levou a uma significativa elevação dos níveis de estradiol (aumento de cerca de 300%) em mulheres que receberam terapia para reposição hormonal. No entanto, é importante avaliar

possíveis riscos e benefícios deste tipo de associação, isto porque uma grande elevação dos níveis de estradiol poderia eventualmente estar correlacionada com maior risco de desenvolvimento de câncer de mama (Puhohit, 1998; Cummings et al., 2009).

Sampson e Shipley (1997) estudaram o efeito do consumo moderado de álcool sobre a densidade óssea mineral em ratas ovariectomizadas aos três meses de idade, tratadas por gavagem, diariamente, com 0,38g/kg de álcool, por 6 semanas. Segundo os autores, a quantidade de álcool utilizada no estudo equivaleria, em humanos, a ingestão de duas taças de vinho por dia. Os autores observaram, mediante análises morfológicas e histomorfométricas do fêmur e tíbia, que havia significativas diferenças nos ossos das ratas ovariectomizadas, no entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos dietéticos.

Recentemente, Tucker et al. (2009) verificaram os efeitos do consumo de cerveja, vinho e licor sobre a densidade óssea mineral e concluíram que o moderado consumo de álcool pode exercer efeitos benéficos sobre a qualidade óssea, em homens mais velhos (média de idade 61,5 anos) e em mulheres após a menopausa (média de idade 62,5 anos). No entanto, estes benefícios parecem ser mais evidentes no consumo de cerveja e vinho se comparados ao licor, o que sugere que fatores adicionais ao álcool poderiam exercer o efeito protetor. O silício, presente em altas concentrações na cerveja, e o resveratrol, no vinho, têm sido as substâncias mais freqüentemente relacionadas aos efeitos benéficos destas bebidas alcoólicas sobre a qualidade óssea (Liu et al., 2005; Jugdaohsingh et al., 2006; Tucker et al., 2009; Zhou et al., 2009)

A literatura revisada sobre o assunto mostrou que os resultados de estudos que observaram os efeitos do álcool sobre a qualidade óssea são muito diversificados dependendo da dose, idade do animal, tipo de dieta ou de bebida alcoólica administrada, métodos de

avaliação e associação com outros fatores, tais como, deficiência estrogênica ou terapias para reposição hormonal.

2.3 Relação entre alcoolismo, nutrição e qualidade óssea

O álcool é uma substância com baixo valor nutricional, mas elevado teor energético (7,1 kcal/g). Indivíduos alcoólatras normalmente não têm uma dieta equilibrada e, muitas vezes, substituem alimentos importantes do ponto de vista nutricional pelo álcool, já que este provoca uma sensação de saciedade, o que acaba levando a um quadro de desnutrição conhecida como primária. Além disto, o alcoolismo pode causar complicações gastrointestinais que causam má digestão e má absorção de nutrientes, mesmo que o aporte seja adequado, o que gera um tipo de desnutrição conhecida como secundária (Lieber, 2000; Moreno Otero; Cortés, 2008).

Os quadros de desnutrição causados pelo alcoolismo podem interferir na saúde geral do indivíduo e favorecer a instalação e agravamento de diversas patologias, inclusive osteoporose. Os nutrientes mais frequentemente citados na literatura como importantes na manutenção da saúde óssea são o cálcio e a vitamina D, mas há outros como o fósforo, flúor, ferro, zinco, cobre e boro, potássio, magnésio, zinco, vitaminas A, C, E, K e as proteínas. Assim um aporte ou absorção inadequada destes nutrientes pode prejudicar a qualidade óssea e favorecer a instalação da osteoporose (Miggiano; Gagliardi, 2005; Bonjour et al., 2009; Heaney, 2009).

Pesquisas que pretendam verificar a influência do álcool sobre o tecido ósseo devem levar em consideração os efeitos prejudiciais de possíveis alterações nutricionais geradas pelo alcoolismo. Em animais, uma maneira eficiente de tentar controlar esta variável é utilizar um grupo

isocalórico ao grupo álcool a fim de procurar estabelecer um pareamento nutricional. Nestes casos a dieta é adaptada de forma que seja oferecida aos animais a mesma quantidade de calorias dos grupos tratados com álcool (Rocha, 2005; Alonso, 2009; Deco, 2009).

Deco (2009) avaliou os efeitos do consumo crônico de álcool e da deficiência estrogênica, por ovariectomia, sobre a osseointegração de implantes de titânio em ratas, utilizado como controles grupos isocalóricos (para simular os efeitos de uma deficiência no aporte nutricional) e com dieta livre. A osseointegração ficou prejudicada no grupo no qual a deficiência estrogênica foi associada ao consumo crônico de álcool bem como no grupo no qual a deficiência estrogênica foi associada à dieta isocalórica. A autora concluiu que a deficiência estrogênica foi capaz de prejudicar a osseointegração apenas quando foi associada ao consumo crônico de álcool ou à deficiência no aporte nutricional.

É interessante observar que o tipo de dieta também pode interferir na qualidade óssea. Halade et al. (2010) observaram efeitos negativos de uma dieta rica em gorduras, contendo óleo de milho a 10%, sobre a qualidade óssea, em ratas de 12 meses de idade, tratadas por um período de 6 meses. Os autores verificaram uma diminuição significativa da densidade óssea mineral na tíbia e fêmur, além de um aumento da expressão de citocinas osteoclastogências, tais como TNF-α e IL-6, em cultura de células do baço e da medula óssea, quando animais tratados foram comparados aos do grupo controle.

2.4 Deficiência estrogênica, álcool e alterações periodontais

A manutenção da integridade do osso alveolar é muito importante para a conservação da saúde periodontal e sua reabsorção

leva à mobilidade e perda dentária. A placa bacteriana é o fator etiológico primário para o desenvolvimento da doença, mas a severidade e a resposta ao tratamento podem ser alteradas dependendo de como o hospedeiro responde ao agente agressor (Pizzo et al., 2009). Alguns autores sugerem que, tanto a deficiência estrogênica quanto o consumo excessivo de álcool, poderiam afetar a resposta do hospedeiro potencializando a perda óssea em decorrência da doença periodontal (Faloni; Cerri, 2007; Amaral et al., 2008). Na deficiência estrogênica e nos processos inflamatórios, mecanismos celulares e moleculares semelhantes levam à perda óssea. Isto poderia justificar a possível relação entre ovariectomia e perda de inserção periodontal, encontrada em alguns estudos (Duarte et al., 2004; Takayanagi, 2005; Faloni; Cerri, 2007). Sabe-se que o alcoolismo também afeta a resposta às infecções, alterando a produção de citocinas e a imunidade celular o que poderia contribuir para o agravamento da doença periodontal (Szabo, 1999).

Apesar de vários autores sugerirem uma associação positiva entre osteoporose e perda óssea oral, as informações disponíveis são insuficientes para que haja um consenso definitivo sobre o assunto, que ainda precisa ser melhor estudado (Elsubeihi; Heersche, 2002; Dervis, 2005; Geurs, 2007; Kuo et al., 2008). Segundo Kuo et al. (2008), é possível que a perda óssea sistêmica associada à osteoporose também possa afetar o osso alveolar e sua porosidade o que levaria a uma maior suscetibilidade à reabsorção óssea na região. Os autores fizeram uma revisão de literatura sobre o assunto e alertam que, apesar da maioria dos estudos sugerir uma relação positiva entre osteoporose e doença periodontal, as conclusões de muitos destes trabalhos necessitam de uma interpretação cautelosa, devido às limitações de muitos desenhos experimentais, tamanho das amostras e controle inadequado de outros fatores conflitantes.

Anbinder et al. (2006) avaliaram os efeitos da deficiência estrogênica como fator de risco para a progressão da doença periodontal.

O estudo foi conduzido em ratas ovariectomizadas ou Sham operadas que receberam ou não indução de periodontite por ligadura. Os animais dos grupos que receberam a ligadura tiveram significativa diminuição do suporte ósseo, maior perda óssea alveolar e envolvimento de furca. Por outro lado, não foram observadas diferenças entre os animais ovariectomizados ou Sham operados. Segundo os autores, baseados nos resultados deste estudo, a deficiência estrogênica não poderia ser considerada um fator de risco para doença periodontal.

Yoshinari et al. (2006) investigaram os efeitos da ovariectomia na progressão da periodontite induzida por ligadura em ratas ovariectomizadas, Sham operadas ou controle. Os autores observaram que nos animais ovariectomizados os tecidos periodontais mostraram severa inflamação e reabsorção óssea alveolar, além de diminuição da densidade óssea mineral. Concluem que a osteoporose pode afetar a progressão da doença periodontal em ratas e sugerem que estudos futuros sejam feitos para esclarecer quais os mecanismos moleculares que determinam ambas as doenças em animais experimentais.

Nicopoulou-Karayianni et al. (2009) verificaram, em estudo epidemiológico, no qual foram avaliadas 665 mulheres com idades variando entre 45 a 70 anos, uma associação positiva significativa entre osteoporose e perda dentária, mesmo depois de ajustar efeitos de fatores conflitantes, tais como, idade e fumo.

Dvorak et al. (2009) fizeram um estudo com ovelhas idosas submetidas à ovariectomia, restrição de cálcio/vitamina D e administração de metilprednizolona (grupo tratado). A qualidade dos tecidos periodontais dos animais foi comparada com os de ovelhas adultas não tratadas (grupo controle). Os pesquisadores verificaram que o tratamento associado à idade afetou significativamente os tecidos periodontais, com perda do suporte conjuntivo e reabsorção óssea alveolar. Os autores sugerem que estudos adicionais sejam realizados

para determinar o impacto isolado da idade, má nutrição, hipogonadismo e aplicação de glicocorticóides na progressão da doença periodontal.

Estudos que mostrem o papel do álcool sobre os ossos da cavidade oral ainda são muito restritos, no entanto, a literatura sugere que possa haver uma correlação positiva entre o consumo de álcool e a progressão da doença periodontal (Souza et al., 2006; Amaral et al., 2008; Irie et al., 2008; Alonso, 2009).

Souza et al. (2006) avaliaram os efeitos do consumo de álcool sobre o suporte periodontal na periodontite induzida por ligadura. Os animais receberam álcool diluído na água oferecida para beber nas concentrações 10, 20 e 30% (v/v). Os grupos foram divididos de forma que os animais recebessem dieta alcoólica ou isocalórica bem como presença ou ausência de ligadura. Após o sacrifício, as mandíbulas foram radiografadas e analisadas por um programa de imagens computadorizado. Os resultados demonstraram que o consumo de álcool, em animais que receberam ligadura, pode ter um efeito direto na perda óssea alveolar aumentando o desenvolvimento da doença periodontal e um efeito indireto nos tecidos periodontais em consequência da má nutrição.

Irie et al. (2008) trabalharam com ratos machos de dez semanas que foram alimentados, por oito semanas, com um líquido nutritivo onde o etanol representava 36% dos valores calóricos totais da dieta (líquido dietético de Lieber-DeCarli). Dependendo do grupo, os animais foram tratados com dieta alcoólica ou isocalórica e receberam ou não indução de periodontite por ligadura quatro semanas antes do término do período experimental. Os autores observaram que o consumo isolado de etanol, mesmo sem a indução da doença periodontal, foi capaz de causar migração apical do epitélio juncional, reabsorção óssea alveolar, maior infiltração de leucócitos polimorfonucleares, aumento do dano oxidativo e exacerbação da produção de TNF-α.

Amaral et al. (2008) avaliaram indivíduos alcoólatras e não alcoólatras para verificar os efeitos do hábito na progressão da doença periodontal. Os autores verificaram uma associação positiva entre a dependência do álcool e o agravamento da doença, mesmo quando foram estatisticamente controlados outros fatores, tais como, idade, placa, ganho salarial, educação, condições de moradia e o fato do indivíduo ser ou não fumante.

Alonso (2009) trabalhou com ratas ovariectomizadas submetidas ao consumo de álcool a 20% e verificou a influência destes fatores sobre a crista óssea alveolar de ratas, na presença ou ausência de periodontite induzida por ligadura. A autora observou perda óssea e processo inflamatório, quando o álcool foi associado à deficiência estrogênica, na ausência de indução da doença periodontal.

2.5 Relação entre alterações nutricionais e doença periodontal

Estudos recentes sugerem que alterações na dieta também poderiam interferir na resposta do hospedeiro à progressão da doença periodontal (Enwonwu; Ritchie, 2007; Chapple, 2009; Jenzsch et al., 2009; Reynolds et al., 2009).

Melhorias na qualidade da dieta podem ter um efeito positivo sobre os tecidos periodontais, melhorando a resposta do hospedeiro à inflamação e diminuindo sua suscetibilidade à progressão da doença. Possivelmente, isto está relacionado ao fato de que processos inflamatórios crônicos provocam stress oxidativo, com aumento da demanda por uma dieta rica em minerais e vitaminas antioxidantes (Enwonwu; Ritchie, 2007; Chapple, 2009). Segundo Chapple (2009), dietas ricas em carboidratos refinados e gorduras saturadas podem estar associadas a respostas hiperinflamatórias, por outro lado, as ricas em

antioxidantes, tais como carotenóides, polifenóis e vitaminas, auxiliam na diminuição da inflamação.

Jenzsch et al. (2009) investigaram a influência de um programa de intervenção nutricional, por um período de 12 meses, em mulheres com síndrome metabólica e periodontite crônica. Os autores propuseram às pacientes uma dieta composta basicamente por folhas, frutas, grãos, batatas, legumes e lacticínios e o consumo de carnes, peixes e ovos era limitado a uma ou duas porções por semana. Não foram observadas mudanças no padrão de higiene oral nem na quantidade de patógenos periodontais, presentes no fluido crevicular, durante o estudo. No entanto, houve uma significativa melhoria nos parâmetros clínicos de avaliação da saúde periodontal, associada à redução na expressão de algumas citocinas pró inflamatórias como IL1-β e IL-6.

Reynolds et al. (2009) estudaram os efeitos de uma dieta com restrição calórica, em primatas machos e fêmeas, na evolução natural da doença periodontal crônica (sem indução de periodontite). Os animais foram tratados por um período de 13 a 17 anos e divididos em grupos controle e com restrição calórica. Ambos receberam uma dieta suplementada com vitaminas e sais minerais, com a diferença de que o grupo com restrição calórica recebeu 30% menos calorias que o controle. Após avaliações clínicas, microbiológicas e da expressão de mediadores químicos do processo inflamatório, os autores observaram que os machos exibiam maiores riscos de desenvolvimento de doença periodontal e que a dieta com restrição calórica reduziu o risco de periodontite em machos, mas não em fêmeas. Enwonwu (2010), em uma carta ao editor, comentando o estudo acima mencionado, sugere que as diferenças encontradas entre machos e fêmeas poderiam ser em parte atribuídas a ações protetoras do estrógeno no último grupo.

2.6 O padrão de mineralização óssea e a análise por espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva.

O osso é um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por 50% a 70% de minerais, 20% a 40% de matriz orgânica, 5% a 10 % de água e menos de 3% de lipídios. Os principais elementos constituintes da fase mineral são o Ca e o P, que se organizam formando cristais de hidroxiapatita [Ca_{10} $(PO_4)_6OH_2$] (Clarke, 2008). A hidroxiapatita sintética estequiométrica apresenta razão molar Ca/P de 1,67 (Ciobanu et al., 2009; Oliveira et al., 2009), calculada considerando-se 10 mols de Ca para 6 mols de P; e relação Ca/P em porcentagem de peso de 2,16 (Tzaphlidou et al., 2006), calculada levando-se em consideração o número de mols e as massas molares do Ca (40,08 g/mol) e do P (30,97 g/mol). Nos tecidos biológicos duros, há um desvio desta estequiometria e outros íons também podem estar presentes, como por exemplo, os carbonatos, os fosfatos ácidos e o magnésio sendo decorrentes de substituições no grupo hidroxila (Clarke, 2008). Como estas substituições têm sido encontradas com frequência, alguns autores preferem utilizar o termo apatita carbonatada não estequiométrica para definir a composição principal da fase mineral óssea (Boivin; Meunier, 2003; Kourkoumelis; Tzaphlidou, 2010). Comparando-se com a hidroxiapatita geológica, os cristais ósseos são pequenos (medindo aproximadamente 200 Å em suas maiores dimensões), pobremente cristalinos e mais solúveis (Clarke, 2008). Esta solubilidade permite a manutenção da homeostase mineral, já que o tecido ósseo é reservatório de íons com importantes funções metabólicas (Clarke, 2008; Moe, 2008).

A composição química e física da estrutura óssea mineral não é estática e pode ser modificada (Kuhn et al., 2008). No indivíduo adulto, o grau de mineralização depende, principalmente, das taxas de remodelação e das alterações na atividade de osteoblastos e osteoclastos

durante este processo. Em casos de aumento das taxas de remodelação, como ocorre na deficiência estrogênica, não há tempo suficiente para que o osso alcance sua mineralização completa antes de ser reabsorvido prematuramente pelos osteoclastos, o que pode afetar a resistência mecânica e a densidade óssea mineral (Meunier; Boivin, 1997; Boivin; Meunier, 2003). Isto parece ser mais evidente quando um aumento das taxas de remodelação ocorre em superfícies ósseas recentemente formadas. Nesses casos, é grande a probabilidade do osso ser reabsorvido antes que a mineralização completa tenha sido alcançada (Ciarelli et al., 2003).

Conhecer a distribuição dos principais elementos químicos presentes na composição do tecido ósseo pode ajudar a entender melhor o padrão de mineralização do tecido e a sua relação com determinadas patologias, como a osteoporose. A determinação das concentrações de Ca, de P ou de ambos e a relação existente entre estas concentrações, pode fornecer uma medida sensível das mudanças ocorridas na fase mineral óssea, contribuindo para uma melhor compreensão de alterações ocorridas na presença de desordens ósseas. (Fountos et al., 1999; Zaichick; Tzaphlidou, 2003; Tzaphlidou et al., 2006).

Existem numerosas técnicas que permitem estudar a composição química elementar do tecido ósseo (Zaichick; Tzaphlidou, 2003). A análise por espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva é uma técnica não-destrutiva que permite uma avaliação qualitativa e semiquantitativa dos elementos químicos presentes em uma amostra. Dessa forma, em tecidos mineralizados, tais como ossos e dentes, é especialmente útil na avaliação das concentrações de Ca e P presentes na amostra e na determinação da relação entre essas concentrações, representando uma importante ferramenta para o entendimento do padrão de mineralização do tecido (Carvalho et al., 2009; Oliveira et al., 2009; Senra, 2009).

A análise por espectrometria de fluorescência de raios-X baseia-se no principio da excitação dos átomos que compõe uma determinada amostra a partir de uma fonte de radiação eletromagnética de alta energia (por exemplo, raios-X provenientes de um alvo metálico). Tal fonte excita os elétrons das camadas mais internas causando ejeção dos mesmos ou migração para uma camada superior, criando lacunas eletrônicas e gerando instabilidade atômica. Para que o átomo volte ao seu estado fundamental, é necessário que elétrons das camadas posteriores (de níveis superiores de energia) preencham as lacunas criadas. O resultado desta transição de elétrons é a emissão de energia na forma de uma radiação secundária fluorescente. O detector do aparelho (espectrômetro) capta a energia do fóton emitido e distingue esta radiação que é característica, bem definida e depende do número atômico do elemento químico presente na amostra. (Todd; Chettle, 1994; Maliska, 2010; Wikipedia, 2010).

Peng et al. (1997) estudaram os efeitos da ovariectomia em ratas sacrificadas até 40 semanas após a operação. Os autores analisaram a região distal do fêmur por energia dispersiva de raios-X e não observaram diferenças significativas nas concentrações de Ca e P, quando os animais ovariectomizados foram comparados aos Sham operados. No entanto, verificaram que havia um decréscimo transitório nas concentrações de magnésio após ovariectomia.

Tanaka et al. (2001) verificaram os efeitos da ovariectomia, na reparação óssea, após extração dentária em ratas. Na análise por energia dispersiva de raios-X, os autores não observaram diferenças nas concentrações de Ca, P e na relação Ca/P, quando os animais ovariectomizados foram comparados aos Sham operados, trinta e sessenta dias após as exodontias.

Reddy Nagareddy e Lakshmana (2005) observaram, por energia dispersiva de raios-X, uma significativa diminuição da relação

Ca/P no fêmur de ratas ovariectomizadas que receberam dieta deficiente em Ca em relação a animais Sham operados que receberam dieta livre.

Suvorova et al. (2007) analisaram amostras de vértebras de indivíduos com osteoporose utilizando microscopia eletrônica (de transmissão e varredura) e energia dispersiva de raios-X. Os autores verificaram o crescimento excessivo de um material orgânico, não mineralizado, criando desordens no osso osteoporótico e sugerem que isto poderia levar a uma dilatação anormal do tecido, gerando micro fissuras, diminuição da densidade mineral e maior predisposição às fraturas.

Moffat et al. (2008), estudaram o relacionamento entre estrutura e função na interface osso ligamento de amostras retiradas da área de junção entre fêmur e tíbia em ossos bovinos. Nesta região, o ligamento está conectado ao osso através de uma interface cartilaginosa. Os autores verificaram as propriedades mecânicas compressivas de regiões mineralizadas e não mineralizadas da interface cartilaginosa e compararam os resultados obtidos com a presença e distribuição de minerais na região, mediante a utilização de energia dispersiva de raios-X acoplada a um microscópio eletrônico de varredura. Picos de Ca e P foram detectados apenas na região de fibrocartilagem mineralizada e osso adjacente. Comparando estas análises com testes biomecânicos a microcompressão, os autores observaram que as regiões de interface calcificada exibiram propriedades mecânicas compressivas significativamente mais altas que as regiões não calcificadas, o que foi atribuído a presença de minerais na região.

Senra (2009) avaliou a qualidade do reparo ósseo em ratas ovariectomizadas ou Sham operadas recebendo ou não tratamento com risedronato. Lesões ósseas foram realizadas no fêmur de animais ovariectomizados ou submetidos à cirurgia Sham. O sacrifício ocorreu 18, 45 e 90 dias após a realização das lesões. Entre outras análises, foi feito um mapeamento da distribuição do Ca e do P, durante os tempos de

reparo estudados, utilizando-se para isto o mesmo espectrômetro de microfluorescência de raios-X que será utilizado neste trabalho (Shimadzu μEDX-1300 - Kyoto - Japan). Dentro da área de mapeamento foram obtidas médias das concentrações de Ca e P em um total de 10 pontos, contidos em uma linha de 0,5 mm de comprimento, que foi selecionada no osso pré existente e dentro do calo ósseo. Tais médias foram posteriormente utilizadas para o cálculo da relação Ca/P. A autora verificou que a ovariectomia diminuiu a concentração de Ca e P e a relação Ca/P somente no início da reparação (aos 18 dias). Já aos noventa dias, nos animais ovariectomizados, foi observada uma maior relação Ca/P dentro do que fora do calo ósseo.

Recentemente, Yan et al. (2010) avaliaram, em um estudo piloto, o efeito da aplicação de dois fatores de crescimento para tratamento de lesões de furca classe III artificialmente criadas em cães. O osso alveolar em regeneração foi avaliado mediante análises histológicas, histomorfométricas e por energia dispersiva de raios-X. Os autores verificaram que a relação Ca/P e a porcentagem de regeneração periodontal foram mais altas nos grupos tratados quando comparadas aos grupos controle. Segundo eles, os resultados sugerem que, a aplicação dos fatores de crescimento, pode melhorar a qualidade e a quantidade de osso em regeneração na região de furca.

Apesar da importância de conhecer as alterações da fase mineral óssea diante de doenças que afetem a qualidade do tecido, ainda são poucos os estudos que fazem este tipo de avaliação. Além disto, na revisão de literatura deste trabalho, não foram encontradas pesquisas que avaliassem as concentrações de Ca e P e a relação Ca/P especificamente na região da crista óssea alveolar, uma estrutura cuja integridade é importante para a manutenção da saúde periodontal.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, utilizando a técnica analítica de microespectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva, possíveis alterações na estequiometria da hidroxiapatita, mediante mensuração das concentrações de Ca, P e da relação Ca/P, na região da crista óssea alveolar, em ratas ovariectomizadas e/ou submetidas ao alcoolismo crônico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para este trabalho foram utilizadas 54 ratas (*Rattus norvegicus,* variação *albinus, Wistar)* com quatro meses de idade. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, mantidos em temperatura ambiente e alimentados com dieta sólida e líquida controladas, dependendo do grupo experimental.

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP sendo aprovado sob protocolo n°021/2008-PA/CEP (Anexo A).

4.1.1 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em seis grupos, com nove animais em cada, de acordo com o tipo de cirurgia realizada e de dieta administrada, conforme pode ser visto no Quadro 1. O tratamento dietético foi feito por 8 semanas e, para melhor controlá-lo, foram colocados apenas 3 animais por gaiola.

Quadro 1 - Grupos experimentais

Grupos	Dieta livre	Álcool	Isocalórico
Ovariectomia simulada (Sham)	G1 (n=9)	G2 (n=9)	G3(n=9)
Ovariectomia (Ovz)	G4 (n=9)	G5(n=9)	G6 (n=9)

Grupo Sham - os animais foram submetidos à ovariectomia simulada (os ovários foram expostos, mas não retirados).
Grupo Ovz - os animais foram submetidos à deficiência estrogênica mediante a retirada dos ovários.
Grupo com dieta livre - os animais receberam água e ração à vontade.
Grupo álcool - os animais receberam álcool a 20% e ração à vontade.
Grupo isocalórico - os animais receberam dieta líquida e sólida com a mesma quantidade de calorias ingeridas pelo grupo álcool no dia anterior.

4.1.2 Dieta dos animais

A dieta sólida empregada para todos os grupos foi a ração Labina® (Purina do Brasil, Paulínia), cuja composição pode ser verificada no Quadro 2. Para G2 e G5, que receberam álcool, foram fornecidos 50 gramas de ração diariamente por animal. No dia seguinte, as porções restantes foram pesadas, e foi obtida a quantidade média de ração ingerida, que foi fornecida para os animais G3 e G6, que são isocalóricos. G1 e G4 receberam dieta sólida livre, sendo registradas as quantidades médias consumidas.

Quadro 2 – Composição da dieta padrão Labina® (Purina do Brasil)

Umidade (Max)	13,0%
Proteína Bruta (Min)	23,0%
Extrato Etéreo (Min)	4,0%
Matéria Fibrosa (Max)	5,0%
Matéria Mineral (Max)	10,0%
Cálcio (Max)	1,3%
Fósforo (Min)	0,85%

Fonte: Purina do Brasil*

Aos animais G2 e G5 foi oferecido álcool etílico ABS.ACS-99,5° (Ecibra, São Paulo). Inicialmente estes animais passaram por período de adaptação de nove dias (três dias ingerindo álcool a 5%, três dias a 10% e três dias a 15%). Posteriormente, foram administradas, por oito semanas, soluções preparadas diariamente na concentração alcoólica de 20%.

Os grupos G2 e G5, que receberam álcool, iniciaram um dia antes de G3 e G6, que são isocalóricos, quando foram fornecidos 50ml de solução alcoólica por animal. No dia seguinte, a solução restante foi medida, sendo registrada a média ingerida. Então, os grupos isocalóricos receberam uma solução de sacarose P.A. (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro) cuja concentração continha, em ml, a mesmas calorias da solução de álcool a 20%. A solução isocalórica foi preparada dissolvendo-se 266 g de sacarose em 1 litro de água e os cálculos foram feitos levando-se em consideração a concentração alcoólica utilizada no presente estudo (20%), a densidade do álcool absoluto (0,787g/ml) e os

*Purina do Brasil. Labina [home page on the internet]. [cited 2010 May 13]. Available from: http://www.nutrimentospurina.com.br/produtos_labina_labina.asp

valores calóricos da sacarose (4,1 kcal/g) e do álcool (7,1 kcal/g). Além da solução isocalórica, os grupos G3 e G6, receberam água à vontade.

4.2 Procedimentos Cirúrgicos

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em sala cuidadosamente limpa, utilizando-se álcool 70%, e com instrumentais devidamente esterilizados.

4.2.1 Anestesia

Os fármacos utilizados nos procedimentos anestésicos e suas respectivas concentrações foram: cloridrato de xilazina 2,3g/100ml (Anasedan® - Vetbrands, Jacareí), substância sedativa e relaxante muscular; e Cloridrato de Ketamina 1,16g/10ml (Dopalen® - Vetbrands, Jacaréi), um anestésico geral.

Inicialmente foi preparada uma solução com 0,8 ml de cloridrato de xilazina e 0,5 ml de cloridrato de Ketamina. Para promover a anestesia geral cada animal recebeu, por via intra muscular, 0,1ml/100g de peso da solução previamente preparada, de forma que um animal de 300 g recebeu 0,3 ml da solução.

4.2.2 Ovariectomia e cirurgia Sham

As ratas pertencentes aos G4, G5 e G6 foram ovariectomizadas aos quatro meses de idade. Após anestesia, depilação da região abdominal lateral e anti-sepsia com álcool iodado, os animais sofreram incisão cirúrgica longitudinal com extensão aproximada de 1 cm na pele e musculatura da região lateral do corpo, próxima ao nível dos rins e abaixo da última costela. Para este procedimento foi utilizada lâmina de bisturi nº15. O ovário foi exposto e, realizou-se uma ligadura logo abaixo do mesmo, com fio de seda nº4 (Ethicon® - Johnson & Johnson, São José dos Campos), sendo este procedimento realizado bilateralmente. Realizou-se, então, a remoção dos ovários, juntamente com a gordura circundante e pequena porção do útero (Figura 1). Ao final dos procedimentos, as camadas musculares e a pele foram suturadas com fio de seda nº4 (Ethicon® - Johnson & Johnson, São José dos Campos). Por fim, foi realizada nova anti-sepsia com álcool iodado na região operada.

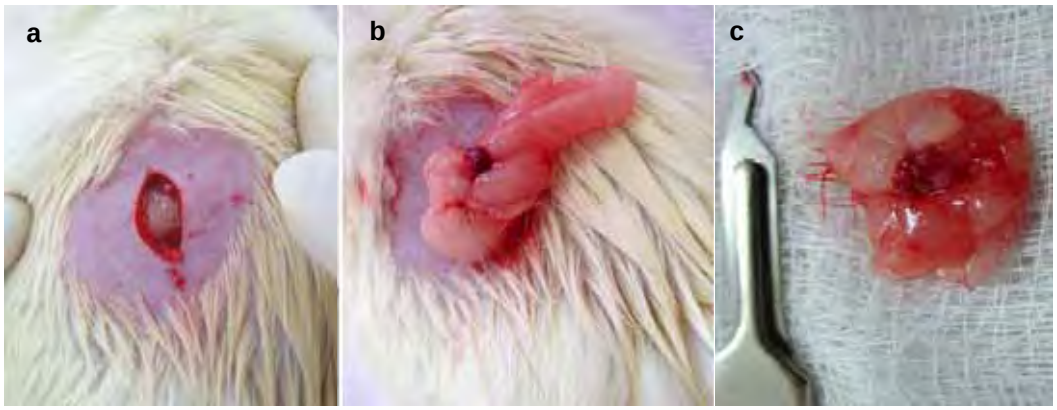


Figura 1 - Ovariectomia: a) Incisão cirúrgica; b) exposição do ovário; c) remoção do ovário

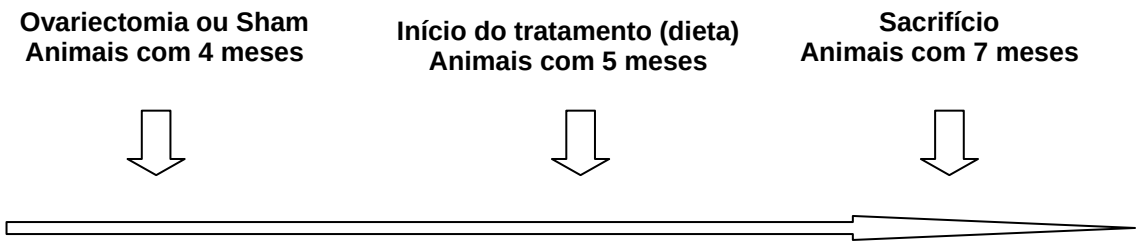
Nos animais do grupo Sham, para simulação do estresse cirúrgico, todos os procedimentos acima foram realizados, exceto a ligadura e remoção dos ovários. Portanto, após a exposição do ovário, os órgãos foram recolocados na cavidade abdominal.

Após as cirurgias os animais receberam o antibiótico benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína, benzilpenicilina potássica e diidroestreptomicina base sulfato em ampola de 6.000.000UI (Pentabiótico® - FortDodge, Porto Alegre) na dose de 1,35ml/kg. Também receberam o antiinflamatório não esteroidal diclofenaco sódico 75mg (Voltaren® - Novartis, Rio de Janeiro), na dose de 1mg/kg. Ambos os fármacos foram administrados em dose única e por via intramuscular.

4.2.3 Sacrifício

Transcorridas oito semanas do início da administração das dietas, todos os animais foram anestesiados e decapitados, antes da remoção das mandíbulas.

4.2.4 Cronograma de procedimentos



4.3 Avaliações de alterações de peso corpóreo e padrão de consumo dietético

4.3.1 Peso corpóreo

No início do experimento e imediatamente antes do sacrifício todos os animais foram pesados em balança semi-analítica (Micronal B600) com a finalidade de verificar possíveis alterações de peso corpóreo em porcentagem. Tais alterações foram mensuradas de acordo com a fórmula abaixo:

$$\textbf{Alterações no peso: (\%)} = \frac{\textbf{Peso final} - \textbf{Peso inicial}}{\textbf{Peso inicial}} \times 100$$

4.3.2 Padrão de consumo dietético

Diariamente foram registrados os valores médios da ração e dieta líquida consumida por gaiola. A partir desses dados foram calculadas médias de consumo por animal para os grupos experimentais, considerando ração ingerida e solução líquida.

4.4 Preparo das amostras

Após o sacrifício, as mandíbulas foram colocadas em soro fisiológico e congeladas -20°C. Posteriormente, todas as amostras foram descongeladas, limpas e colocadas em solução de formol a 10% por 24 horas, visando facilitar a padronização do procedimento de fixação, afim de que todas recebessem exatamente o mesmo tratamento químico. A fixação de amostras biológicas em soluções a base de formol, previamente à análise por energia dispersiva de raios-X, já foi preconizada por outros autores (Tanaka et al., 2001; Arnold; Gaengler, 2007; Suvorova et al., 2007; Yan et al., 2010). Após a fixação, as mandíbulas foram lavadas em água, secas e congeladas em embalagens individuais a -20°C. Apenas as hemimandíbulas do lado direito foram analisadas no presente trabalho, as do lado esquerdo receberam o mesmo tratamento, porém, permaneceram congeladas para realização de estudos posteriores.

As amostras foram cortadas por desgaste na região da crista óssea alveolar entre o 1° e 2° molar inferior. Para conseguir uma melhor padronização dos cortes o incisivo foi previamente retirado e a face interna do corpo da mandíbula aplainada mediante a utilização de uma broca diamantada utilizando alta rotação (Figura 2).

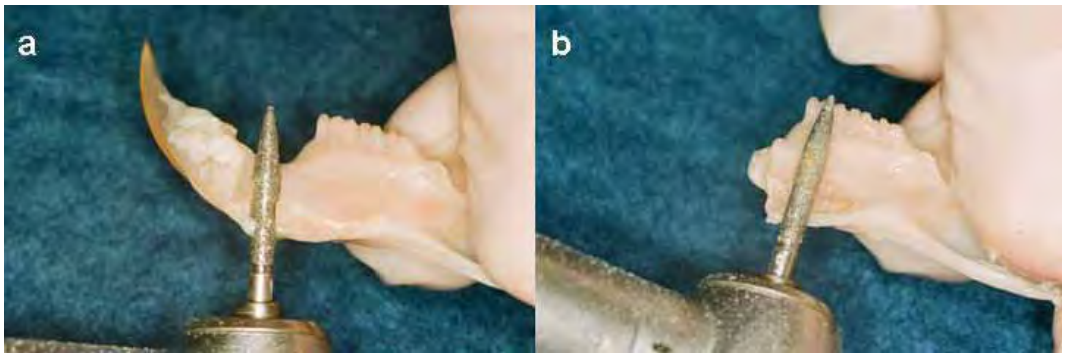


Figura 2 - Fotografia da mandíbula do animal sendo preparada mediante a utilização de uma broca diamantada: a) incisivo sendo retirado; b) aplainamento da face interna do corpo da mandíbula

As mandíbulas foram fixadas com resina acrílica quimicamente ativada (Jet® - Clássico, Campo Limpo Paulista), em uma placa de placa de vidro, de tal forma que as superfícies disto lingual do 1° molar e mésio lingual 2° molar, na região da crista óssea alveolar, estivessem apoiadas na superfície da placa sem a presença de báscula. A base de resina serviu como apoio para que, posteriormente, as amostras fossem cortadas com uma angulação relativamente padronizada (Figura 3). Na face oposta à superfície de interesse foi realizado um apoio para os dedos do operador a fim de protegê-los durante os procedimentos posteriores (Figura 4).

Figura 3 - Amostra da mandíbula fixada com resina acrílica quimicamente ativada, em uma placa de vidro. As superfícies disto lingual do 1° molar e mésio lingual do 2° molar ficaram apoiadas na superfície da placa.

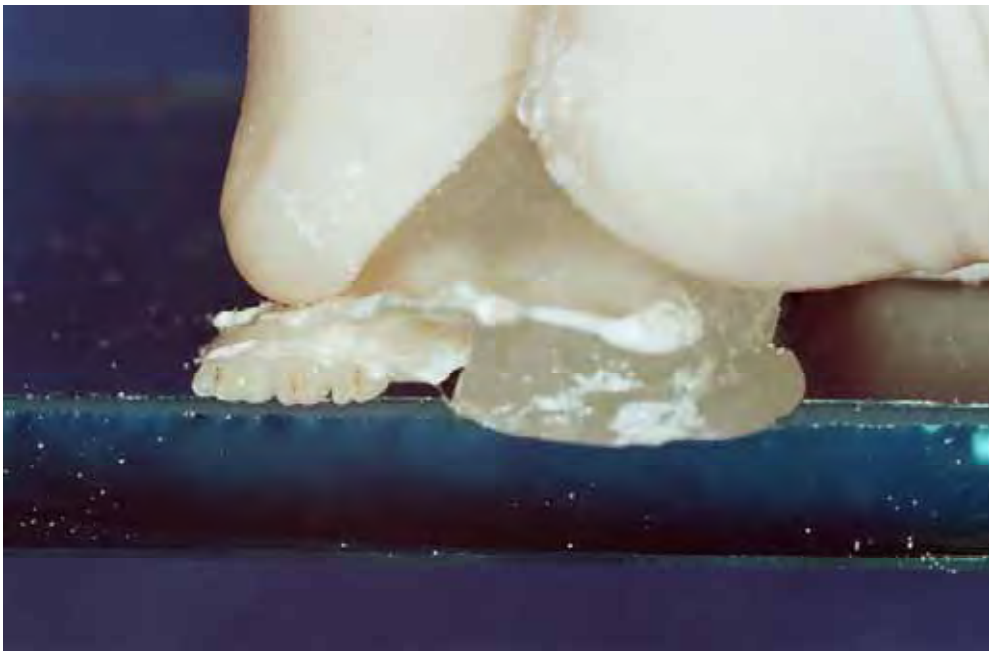


Figura 4 - Amostra da mandíbula fixada em resina acrílica mostrando o apoio para os dedos do operador, a fim de protegê-los durante os procedimentos de desgaste.

Para realização dos desgastes foram utilizadas lixas d'água n° 1200 acopladas a uma politriz (Labpol 8-12 - Extec), refrigerada com água e ajustada para realizar 200 rotações por minuto. As superfícies das lixas foram analisadas e trocadas periodicamente a fim de evitar a presença de irregularidades nos cortes. Todos os desgastes foram realizados em intervalos de 5 segundos até que a parte interna da cortical da crista óssea alveolar existente entre as raízes distal do 1° molar e mesial do 2° molar pudesse ser visualizada. Este intervalo tinha duas finalidades: evitar o aquecimento da amostra e observar com relativa exatidão o momento em que a parte interna da cortical da crista óssea alveolar foi encontrada. Para que as análises fossem feitas em uma área mais central da crista óssea, a região foi novamente desgastada, por mais trinta segundos, sempre respeitando o intervalo de 5 segundos entre um desgaste e outro. Durante os intervalos, a qualidade superficial dos cortes foi analisada com o auxílio de um estereomicroscópio (Stemi 2000-C - Zeiss).

Após o término dos procedimentos de desgaste as amostras foram colocadas em um Becker contendo 200 ml de água destilada e levadas a uma cuba ultra-sônica por 20 minutos (em 2 ciclos de 10 minutos), visando retirar eventuais impurezas impregnadas na superfície da amostra durante a preparação das mesmas.

4.5 Microespectrometria de fluorescência de raios-X

Os procedimentos descritos no item anterior (preparo das amostras) permitiram que a região de interesse, no caso a crista óssea alveolar, fosse observada em uma superfície plana, o que foi fundamental durante o mapeamento por espectrometria de fluorescência de raios-X. Isto porque o espectrômetro assume que as diferenças entre as

intensidades dos picos nos espectros da amostra desconhecida e do padrão sejam relacionadas unicamente a diferenças de composição ou teor elemental. Assim, irregularidades na superfície da amostra podem influenciar a interação dos elétrons e a propagação dos raios-X (Maliska, 2010).

As concentrações de Ca e P e proporção relativa Ca/P presentes na área de interesse foram mensuradas mediante a utilização de um espectrômetro de microfluorescência de raios-X por energia dispersiva (μEDX 1300 Shimadzu - 50 μm) (Figuras 5 e 6). A amostra foi excitada por meio de um feixe de raios-X característico proveniente de um tubo de ródio acoplado a um sistema computadorizado. O diâmetro do feixe focado sobre a amostra foi de 50 μm. A contagem da radiação feita por um detector semicondutor de Si (Li) refrigerado por nitrogênio líquido.

Figura 5 - Espectrômetro de microfluorescência de raios-X por energia dispersiva (μEDX 1300 Shimadzu – 50μ).

Figura 6 - Visualização da amostra já cortada mediante a utilização de uma câmara acoplada ao espectrômetro de fluorescência de raios-X. O laser indica a região a ser analisada.

Inicialmente as amostras foram mapeadas em uma área retangular, que incluiu a crista óssea alveolar, o que originou uma janela com 0,80 X 0,60 mm (40X30 pontos com passos de 20 μm) (Figura 7). A tensão foi de 15 kV com ajuste automático da corrente. O tempo necessário para o mapeamento de cada amostra foi de aproximadamente 260 minutos. A calibração do equipamento utilizou, como referência, um reagente comercial certificado de hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (Aldrich®, grau de pureza 99.999% sintética). A relação Ca/P, em porcentagem de peso, utilizada para comparar os resultados obtidos foi 2,16, calculada a partir da estequiometria. Os cálculos foram obtidos considerando-se 10 mols de Ca com massa molar 40,08 g/mol e 6 mols de P com massa molar 30,97 g/mol. As medidas foram coletadas utilizando-se os parâmetros fundamentais de emissão de raios-X característicos dos elementos químicos Ca e P. Os elementos O (oxigênio) e H (hidrogênio) foram utilizados para balanço químico.

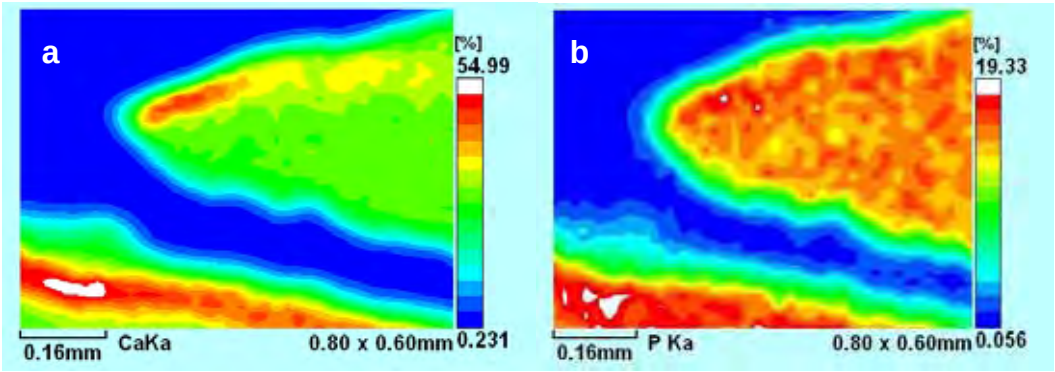


Figura 7 – Região da crista óssea alveolar após o mapeamento. Amostra do grupo Sham dieta livre. a) mapeamento do cálcio; b) mapeamento do fósforo.

4.5.1 Análise semiquantitativa em linha

Para a análise semiquantitativa, após a obtenção da imagem do mapeamento, foi traçada uma linha de 0,3 mm de comprimento, no centro da crista óssea alveolar, aproximadamente 0,1 mm abaixo da ponta crista, na qual foram obtidas as médias das concentrações de Ca e P presentes. Tais médias foram utilizadas para a realização do cálculo da relação Ca/P. Esta região foi escolhida por tratar-se de uma área relativamente homogênea da amostra para ambos os elementos químicos (Figuras 8 e 9).

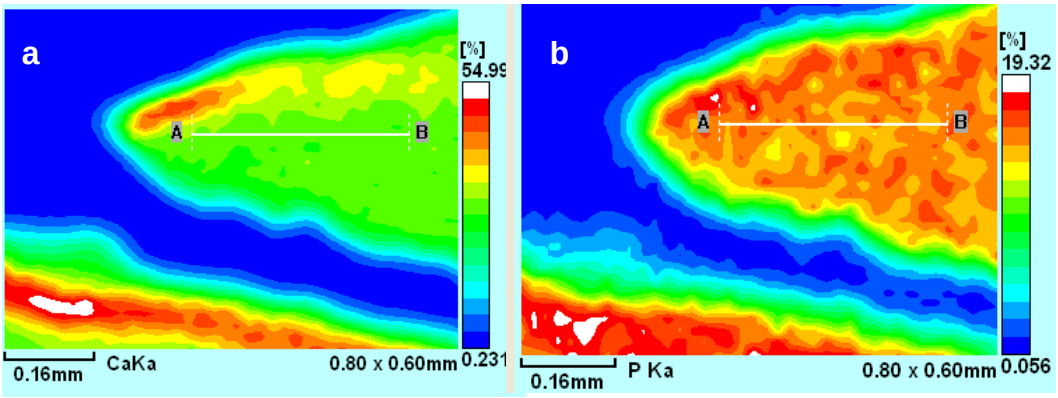


Figura 8 – Linha AB de 0,3 mm de comprimento, traçada no centro da crista óssea alveolar, aproximadamente 0,1 mm abaixo da ponta da crista. Amostra do grupo Sham dieta livre. a) mapeamento do cálcio; b) mapeamento do fósforo.

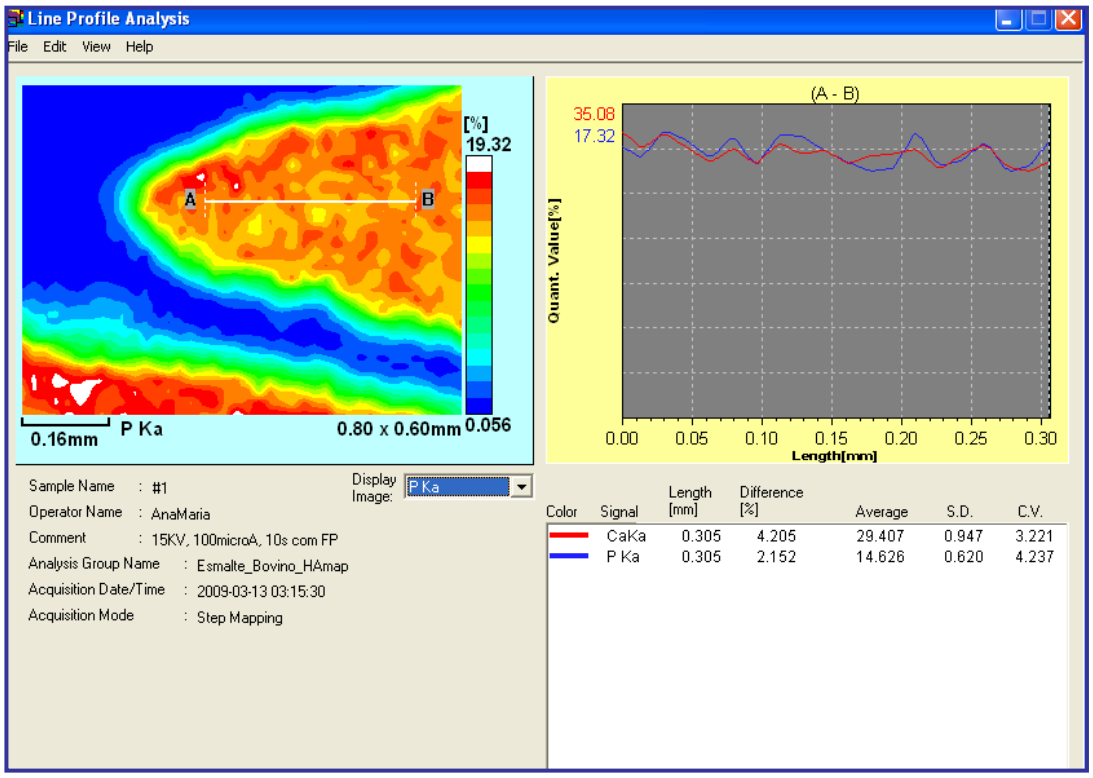


Figura 9 – Análise das concentrações de Ca e P na linha AB. Neste caso, a média das concentrações de Ca e P foram 29,407 % e 14,626 %, respectivamente, e a relação Ca/P calculada foi 2,011. Amostra do grupo Sham dieta livre.

4.5.2 Análise descritiva

Na análise descritiva, foi observado se havia diferenças visualmente evidentes entre as amostras dos diferentes grupos experimentais. Para tanto, foi necessária uma padronização da escala de cores, utilizando como parâmetros os maiores e menores valores das concentrações de Ca e P, em porcentagem, encontrados na totalidade das amostras durante os mapeamentos.

4.5.3 Colaborações

Estas análises foram realizadas no Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica na Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP, São José dos Campos - SP), com a colaboração da Profa. Dra. Ana Maria do Espírito Santo.

4.6 Análise estatística

Os dados relativos ao peso e dieta dos animais não apresentaram distribuição normal e foram submetidos a testes não paramétricos (Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Wilcoxon).

Os dados obtidos pela espectrometria apresentaram distribuição normal e foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey.

Todas as comparações foram feitas com um nível de significância de 5%.

Também foram apresentadas análises descritivas de valores, tais como, médias, medianas, desvios padrão e coeficientes de variação.

5 RESULTADOS

5.1 Variações no número de amostras por grupo

Durante o experimento algumas amostras foram perdidas ou suas análises descartadas, o que alterou o número final de amostras analisadas (Tabela 1). Dois animais morreram antes do final do tratamento; 2 amostras foram perdidas durante os procedimentos de desgaste e nem chegaram a ser mapeadas; 8 amostras foram descartadas em função de problemas apresentados durante o mapeamento (falhas na padronização dos cortes ou dificuldade de encontrar adequadamente a região da crista óssea alveolar, mesmo após a análise ter sido repetida).

Tabela 1 – Variação do número de amostras por grupo

Grupo	N° de amostras iniciais	N° de amostras finais
Sham livre	9	7
Ovz livre	9	7
Sham álcool	9	7
Ovz álcool	9	8
Sham iso	9	7
Ovz iso	9	6

5.2 Alterações no peso dos animais

Os valores das alterações de peso em percentual foram comparados conforme descritos nas tabelas 2 e 3 (testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com nível de significância de 5%). Em todos os grupos houve um ganho no peso médio dos animais durante o experimento. Pode-se observar que o grupo no qual houve maior ganho do peso, em percentual, foi o OVZ dieta livre (ganho médio de 30,9% ± 12,6%), sendo considerado estatisticamente diferente de todos os demais.

Tabela 2 - Análise descritiva comparando o ganho de peso em percentual nos vários grupos experimentais

Peso (Ganho%)	Sham livre	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso	Ovz iso
Média	19,9%	30,9%	15,9%	13,9%	11,1%	17,3%
Mediana	19,8%	27,8%	18,8%	15,0%	11,5%	14,8%
Desvio Padrão	6,2%	12,6%	5,1%	9,2%	5,0%	11,3%
Q1	17,1%	23,9%	12,0%	10,0%	8,3%	10,4%
Q3	23,5%	35,7%	19,6%	18,3%	14,9%	18,5%
N	8	8	9	9	9	9
IC	4,3%	8,7%	3,4%	6,0%	3,3%	7,4%
Valor de p			0,003*			

Q1 - 1º quartil
Q3 - 3° quartil
N - tamanho da amostra (considerando-se o número de animais em cada grupo)
IC - intervalo de confiança
* valor considerado estatisticamente significativo

Tabela 3 - Valores de p comparando o ganho de peso em percentual

	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso	Ovz iso
Sham livre	0,036 *	0,177	0,112	0,009 *	0,178
Ovz livre		0,004 *	0,009*	0,001 *	0,027 *
Sham álcool			0,479	0,070 #	0,626
Ovz álcool				0,251	0,825
Sham iso					0,171

* diferença estatisticamente significativa
# os valores de p estão próximos do limite de aceitação (tendência a diferença)

Também foi feita a análise referente ao peso dos animais por valor absoluto, comparando os dados obtidos no início (ovariectomia ou cirurgia Sham) e no final do experimento (sacrifício). Para esta análise foi utilizado o teste de Wilcoxon com nível de significância de 5%, pois se tratam de dados pareados nos quais o mesmo indivíduo é pesquisa e controle de si mesmo. Verificamos que houve um aumento estatisticamente significativo de peso em todos os grupos (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação entre os pesos iniciais e no sacrifício por grupo experimental

Peso		Média	Mediana	Desvio Padrão	Q1	Q3	N	IC	Valor de p
Ovz álcool	Inicial	278,9	270	16,9	270	300	9	11,1	0,011 *
	Sacrifício	317,8	325	32,4	305	345	9	21,2	
Ovz iso	Inicial	270,6	270	24,3	260	280	9	15,9	0,008 *
	Sacrifício	316,1	310	28,0	310	330	9	18,3	
Ovz livre	Inicial	273,1	270	16,2	268	290	8	11,3	0,012 *
	Sacrifício	356,3	355	25,7	338	378	8	17,8	
Sham álcool	Inicial	262,2	260	21,7	240	280	9	14,2	0,008 *
	Sacrifício	303,3	310	19,0	285	315	9	12,4	
Sham iso	Inicial	266,1	270	21,3	260	280	9	13,9	0,008 *
	Sacrifício	295,0	290	17,7	285	305	9	11,5	
Sham livre	Inicial	248,1	243	24,0	229	270	8	16,7	0,012 *
	Sacrifício	297,5	290	31,3	279	326	8	21,7	

Q1 - 1º quartil
Q3 - 3° quartil
N - tamanho da amostra (considerando-se o número de animais em cada grupo)
IC - intervalo de confiança
* valores considerados estatisticamente significativos

5.3 Variações na ingestão de ração

Os dados relativos ao consumo de ração foram descritos e comparados nas tabelas 5 e 6 (testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com nível de significância de 5%). O grupo que mais consumiu ração foi o Ovz dieta livre (18,6 g ± 1,46) sendo diferente estatisticamente de todos os demais com exceção do Sham dieta livre. Apesar de não haver diferença estatística entre o Sham dieta livre e o OVz dieta livre, deve-se considerar que o valor de p está muito próximo do limite de aceitação o que indica uma tendência a diferença (p=0,058). Observou-se, também, que os grupos isocalóricos consumiram toda a ração que lhes foi oferecida, o que fez com que houvesse uma equivalência no consumo de ração entre os grupos Ovz álcool e Ovz isocalórico e Sham álcool e Sham isocalórico, que consumiram respectivamente em média 12,81 g ± 1,44 e 12,91 g ± 1,58.

Tabela 5 - Comparação entre os grupos experimentais para ingestão de ração em gramas

Ração (g/dia/animal)	Sham livre	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso	Ovz iso
Média	16,84	18,46	12,91	12,81	12,91	12,81
Mediana	16,19	18,48	12,62	12,60	12,62	12,60
Desvio Padrão	2,08	1,46	1,58	1,44	1,58	1,44
Q1	15,52	17,51	12,26	12,21	12,26	12,21
Q3	18,11	19,83	12,71	13,31	12,71	13,31
N	8	8	8	8	8	8
IC	1,44	1,01	1,09	1,00	1,09	1,00
Valor de p	<0,001*					

Q1 - 1º quartil
Q3 - 3° quartil
N - tamanho da amostra (considerando a média de ração ingerida durante as 8 semanas de tratamento)
IC - intervalo de confiança
* valor considerado estatisticamente significativo

Tabela 6 - Valores de p para ingestão de ração

	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso	Ovz iso
Sham livre	0,058 #	0,005 *	0,002 *	0,005 *	0,002 *
Ovz livre		0,001 *	0,001 *	0,001 *	0,001 *
Sham álcool			1,000	1,000	1,000
Ovz álcool				1,000	1,000
Sham iso					1,000

* diferença estatisticamente significativa
# os valores de p estão próximos do limite de aceitação (tendência a diferença)

5.4 Variações na ingestão de líquidos

Os dados relativos ao consumo de líquidos foram descritos e comparados nas tabelas 7 e 8 (testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney com nível de significância de 5%). Os líquidos avaliados foram solução de álcool (20%), solução de sacarose (26,6%) e água, em relação aos grupos álcool, isocalórico e dieta livre respectivamente. Apesar de termos oferecido aos grupos isocalóricos uma solução de sacarose equivalente a solução alcoólica consumida pelos grupos álcool, verificamos que os animais não ingeriram todo o líquido a eles disponibilizado. O grupo Ovz álcool ingeriu uma média de 16,24 ml ± 1,41 de solução alcoólica por dia/animal, já o Ovz isocalórico ingeriu 11,37 ml ± 1,38 de solução isocalórica, sendo esta diferença estatisticamente significativa. O grupo Sham álcool ingeriu 17,13 ml ± 1,89, já o grupo Sham isocalórico ingeriu 10,52 ml ± 1,30, sendo a diferença considerada estatisticamente significativa. Por outro lado, quando comparamos o grupo Sham álcool com o Ovz álcool ou o Sham isocalórico com o Ovz isocalórico não verificamos diferenças significativas entre eles (p=1,41 e 0,227 respectivamente).

Tabela 7 - Comparação entre os grupos experimentais para ingestão de líquidos em mililitros

Líquido (ml/dia/animal)	Sham livre	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso	Ovz iso
Média	32,02	24,98	17,13	16,24	10,52	11,37
Mediana	31,69	24,58	16,93	15,90	10,38	11,05
Desvio Padrão	3,48	3,16	1,89	1,41	1,30	1,38
Q1	30,51	22,39	16,48	15,24	9,78	10,37
Q3	33,61	27,68	17,04	16,77	10,96	12,27
N	8	8	8	8	8	8
IC	2,41	2,19	1,31	0,98	0,90	0,95
Valor de p	<0,001*					

Q1 - 1º quartil
Q3 - 3° quartil
N - tamanho da amostra (considerando a média de líquidos ingeridos durante as 8 semanas de tratamento)
IC - intervalo de confiança
* valor considerado estatisticamente significativo

Tabela 8 - Valores de p para ingestão de líquidos

	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso	Ovz iso
Sham livre	0,002 *	0,001 *	0,001 *	0,001 *	0,001 *
Ovz livre		0,001 *	0,001 *	0,001 *	0,001 *
Sham álcool			0,141	0,001 *	0,001 *
Ovz álcool				0,001 *	0,001 *
Sham iso					0,227

* diferença estatisticamente significativa

5.5 Cálculo da média de álcool ingerida por kg de peso/dia

Avaliou-se também a quantidade de álcool absoluto consumida por Kg de peso de animal/dia conforme descrito na Tabela 9. Este cálculo foi feito considerando animais com peso aproximado de 300 gramas. Os resultados indicam que os animais consumiram o equivalente a 8,76 g de álcool absoluto por kg de peso/dia.

Tabela 9 – Valores médios da ingestão de álcool por dia/animal

Ingestão de álcool	OVZ álcool	Sham álcool	Média
Média da ingestão de solução alcoólica 20% (por animal/dia em ml)	16,24 ml	17,13 ml	16,69 ml
Média da ingestão de álcool absoluto (por animal/dia em ml)	3,25 ml	3,43 ml	3,34 ml
*Média da ingestão de álcool absoluto (por animal/dia em gramas)	2,56 g	2,70 g	2,63 g
**Média da ingestão de álcool absoluto (por Kg de peso/dia em gramas)	8,52 g	8,99 g	8,76 g

*considerando-se que 1000 ml de álcool equivalem a 787 g, conforme informações do fabricante

** os cálculos levaram em consideração um animal com peso médio de 300 g.

5.6 Análise descritiva das amostras após a padronização da escala de cores

Após o mapeamento de todas as amostras, verificou-se que os maiores valores encontrados para as concentrações de Ca e P em porcentagem de peso foram 78,34% e 26,25% e os menores foram 0,035% e 0,000% respectivamente. Estes valores foram utilizados para padronizar a escala de cores na área mapeada. Levando em consideração apenas a análise descritiva por inspeção visual, não foi possível afirmar que existiam diferenças evidentes entre os grupos experimentais (Figura 10).

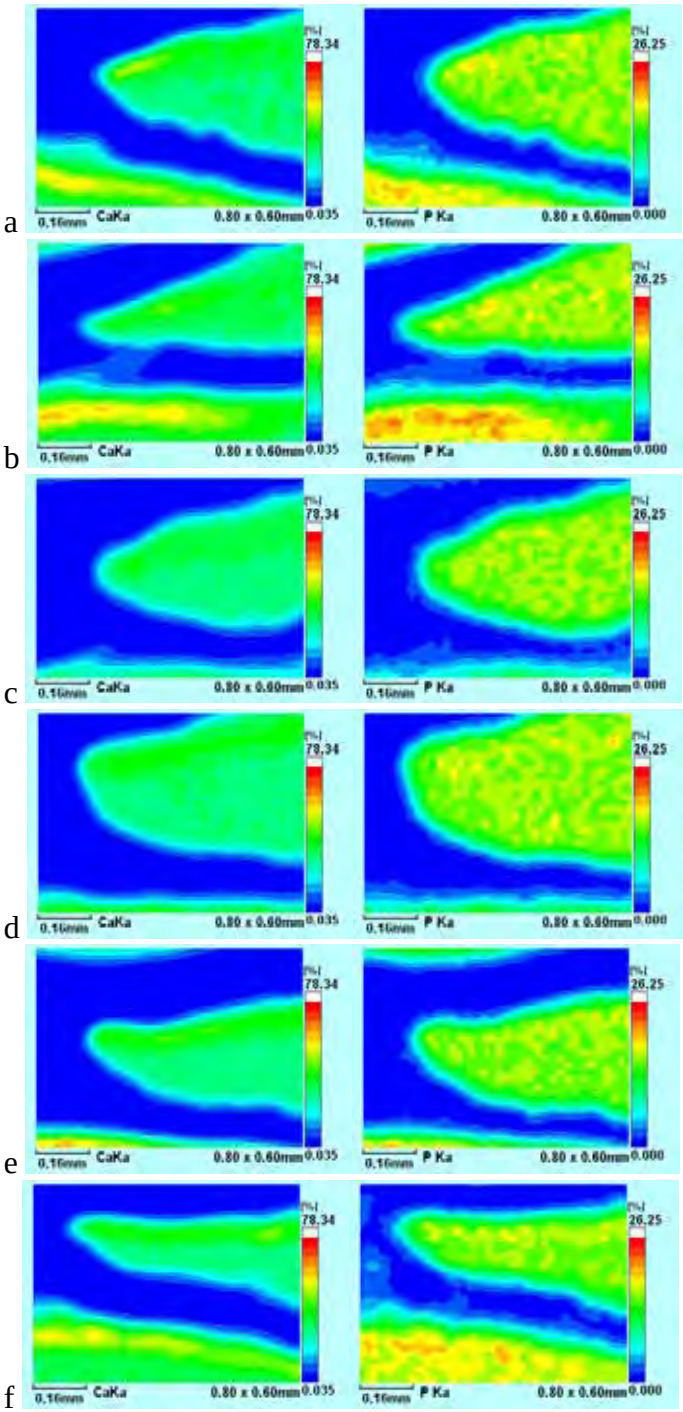


Figura 10 - Exemplo de imagens do mapeamento obtidas após a padronização da escala de cores. A coluna da esquerda mostra o mapeamento para o elemento químico Ca e a da direita para o P (em % de peso). As letras representam os diferentes grupos experimentais. a) Sham dieta livre; b) OVZ dieta livre; c) Sham álcool; d) OVZ álcool; e) Sham Isocalórico; f) OVZ isocalórico

5.7 Análise semiquantitativa dos dados obtidos pela espectrometria

Os dados obtidos pela espectrometria foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey. As comparações foram feitas por paridade inter grupos com nível de significância de 5% ($p<0,05$).

5.7.1 Análise das concentrações de Ca em porcentagem de peso

A análise das concentrações de Ca em porcentagem de peso pode ser visualizada nas Tabelas 10 e 11 e na Figura 11. Os menores valores médios foram obtidos no grupo Ovz álcool (média de 27,71% ± 1,13), o qual foi considerado estatisticamente diferente dos demais grupos, com exceção dos isocalóricos. Por outro lado, as maiores concentrações de Ca foram obtidas na análise do grupo Ovz dieta livre (média de 31,21% ± 0,74), o qual foi considerado estatisticamente diferente dos demais grupos, com exceção do Sham dieta livre.

Tabela 10 - Análise descritiva para o elemento químico Ca (em porcentagem de peso) nos vários grupos experimentais

Grupos	N	Média	Desvio padrão	Mediana	CV%
Sham livre Ca	7	30,39	0,76	30,47	2,50 %
Ovz livre Ca	7	31,21	0,74	31,34	2,37 %
Sham álcool Ca	7	29,92	0,86	29,63	2,87 %
Ovz álcool Ca	8	27,71	1,13	27,63	4,08 %
Sham iso Ca	7	27,76	0,48	27,69	1,73 %
Ovz iso Ca	6	28,03	0,75	28,03	2,68 %

N= tamanho da amostra
CV%= coeficiente de variação em porcentagem

Tabela 11 - Valores de p para o elemento químico Ca

Grupos	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso	Ovz iso
Sham livre	p>0,05	p>0,05	p<0,001 ***	p<0,001 ***	p<0,001 ***
Ovz livre		p<0,05 *	p<0,001 ***	p<0,001 ***	p<0,001 ***
Sham álcool			p<0,001 ***	p<0,001 ***	p<0,001 ***
Ovz álcool				p>0,05	p>0,05
Sham iso					p>0,05

p>0,05 – diferenças estatisticamente não significativas
p<0,05 * – diferenças estatisticamente significativas
p<0,001 *** – diferenças estatisticamente muito significativas

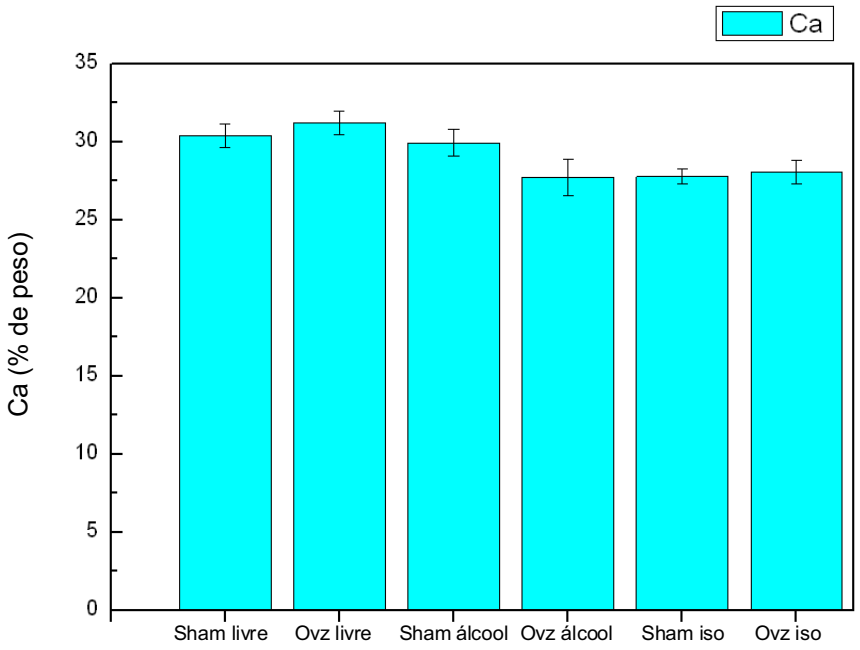


Figura 11 - Média e desvio padrão dos valores das concentrações de Ca, em porcentagem de peso, em cada um dos grupos experimentais.

5.7.2 Análise das concentrações de P em porcentagem de peso

A análise das concentrações de P em porcentagem de peso pode ser visualizada na Tabelas 12 e 13 e na Figura 12. Os menores valores médios foram obtidos no grupo Sham isocalórico (média de 14,12% ± 0,25), o qual foi considerado estatisticamente diferente dos demais grupos, com exceção do Ovz álcool e OVZ isocalórico. Por outro lado, as maiores concentrações de P foram obtidas na análise do grupo Ovz dieta livre (média de 15,37% ± 0,28), o qual foi considerado estatisticamente diferente dos demais grupos, com exceção do Sham dieta livre e Sham álcool.

Tabela 12 - Análise descritiva para o elemento químico P (em porcentagem de peso) nos vários grupos experimentais

Grupos	N	Média	Desvio padrão	Mediana	CV%
Sham livre P	7	15,15	0,39	15,11	2,57 %
Ovz livre P	7	15,37	0,28	15,41	1,82 %
Sham álcool P	7	14,97	0,41	14,86	2,74 %
Ovz álcool P	8	14,44	0,39	14,35	2,70 %
Sham iso P	7	14,12	0,25	14,12	1,77 %
Ovz iso P	6	14,20	0,22	14,12	1,55 %

N= tamanho da amostra
CV%= coeficiente de variação em porcentagem

Tabela 13 - Valores de p para o elemento químico P

Grupos	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso	Ovz iso
Sham livre	p>0,05	p>0,05	p<0,001 ***	p<0,001 ***	p<0,001 ***
Ovz livre		p>0,05	p<0,001 ***	p<0,001 ***	p<0,001 ***
Sham álcool			p<0,05 *	p<0,001 ***	p<0,001 ***
Ovz álcool				p>0,05	p>0,05
Sham iso					p>0,05

p>0,05 – diferenças estatisticamente não significativas
p<0,05 * – diferenças estatisticamente significativas
p<0,001 *** – diferenças estatisticamente muito significativas

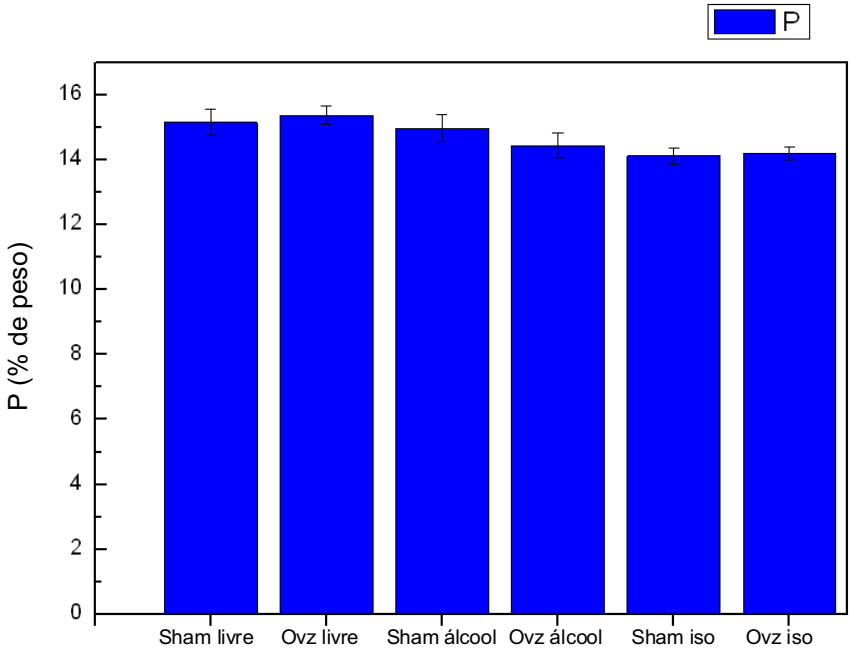


Figura 12 - Média e desvio padrão dos valores das concentrações de P, em porcentagem de peso, em cada um dos grupos experimentais.

5.7.3 Análise da relação Ca/P

A análise da relação Ca/P pode ser visualizada na Tabelas 14 e 15 e na Figura 13. Os menores valores médios foram obtidos no grupo Ovz álcool (média de 1,92 ± 0,06), o qual foi considerado estatisticamente diferente dos demais grupos, com exceção do Sham isocalórico. Por outro lado, os maiores valores na relação Ca/P foram obtidos na análise do grupo Ovz dieta livre (média de 2,03 ± 0,04), o qual foi considerado estatisticamente diferente dos demais grupos, com exceção do Sham dieta livre e Sham álcool. Deve-se observar também que, em relação ao grupo Sham dieta livre o grupo Ovz álcool foi o único que apresentou valor estatisticamente diferente ($p<0,001$), caracterizado por uma diminuição da relação Ca/P.

Tabela 14 - Análise descritiva para a relação Ca/P nos vários grupos experimentais

Grupos	N	Média	Desvio padrão	Mediana	CV%
Sham livre Ca/P	7	2,01	0,01	2,01	0,50 %
Ovz livre Ca/P	7	2,03	0,04	2,02	1,97 %
Sham álcool Ca/P	7	2,00	0,01	2,00	0,50 %
Ovz álcool Ca/P	8	1,92	0,06	1,90	3,13 %
Sham iso Ca/P	7	1,97	0,02	1,97	1,02 %
Ovz iso Ca/P	6	1,97	0,03	1,98	1,52 %

N= tamanho da amostra
CV%= coeficiente de variação em porcentagem

Tabela 15 - Valores de p para a relação Ca/P

Grupos	Ovz livre	Sham álcool	Ovz álcool	Sham iso	Ovz iso
Sham livre	p>0,05	p>0,05	p<0,001 ***	p>0,05	p>0,05
Ovz livre		p>0,05	p<0,001 ***	p<0,05 *	p<0,05 *
Sham álcool			p<0,001 ***	p>0,05	p>0,05
Ovz álcool				p>0,05	p<0,05 *
Sham iso					p>0,05

p>0,05 – diferenças estatisticamente não significativas
p<0,05 * – diferenças estatisticamente significativas
p<0,001 *** – diferenças estatisticamente muito significativas

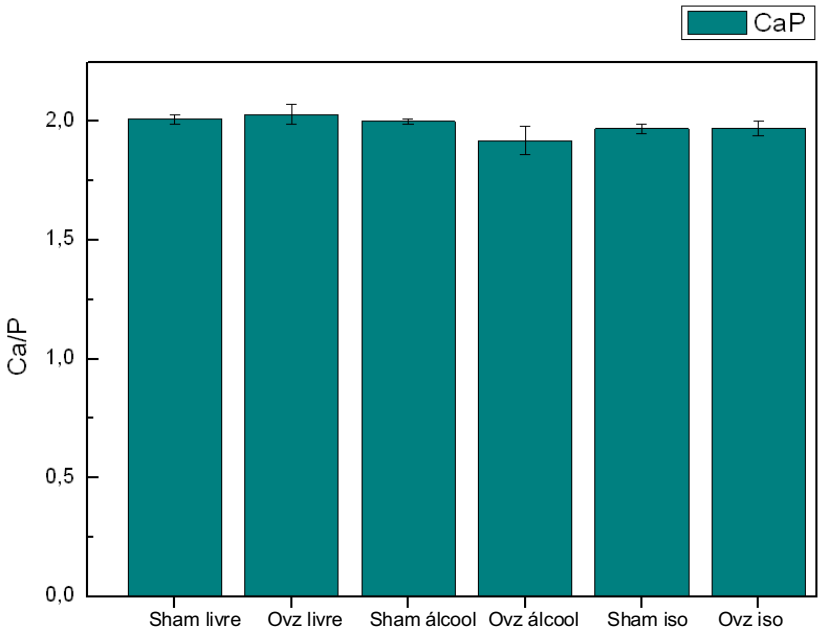


Figura 13 - Média e desvio padrão dos valores da relação Ca/P em cada um dos grupos experimentais.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, a metodologia referente ao tratamento dos animais foi baseada em experimentos prévios realizados no Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP (Rocha, 2005; Alonso, 2009; Deco, 2009). A relativa padronização do tratamento facilitou a comparação dos resultados com outros trabalhos.

Os resultados sugerem que os animais foram submetidos a um consumo crônico e excessivo de álcool (média de 8,76 g de álcool por kg de peso/dia). O valor é próximo ao preconizado por Broulik et al. (2009) em cujo experimento os animais consumiram 7,6 g de etanol 95%/kg de peso/dia. Segundo estes autores, isto seria o equivalente ao consumo diário de 1 litro de vinho ou 2,5 litros de cerveja para um homem adulto. Por outro lado, a quantidade de álcool consumida por nossos animais foi aproximadamente 23 vezes maior que a preconizada por Sampson e Shipley (1997), que realizaram um trabalho no qual os autores verificaram os efeitos do consumo moderado de etanol, tratando ratas por gavagem com 0,38 g de álcool por kg de peso/dia (segundo eles, isto seria o equivalente ao consumo diário de aproximadamente 2 taças de vinho a 12% para uma mulher com cerca de 63 kg). Estes dados são importantes, já que a maioria dos pesquisadores parece acreditar que os efeitos prejudiciais do álcool sobre o tecido ósseo só podem ser verificados diante do consumo excessivo e não no consumo moderado (Berg et al., 2008; Alvisa-Negrín et al., 2009).

A variação de estequiometria da hidroxiapatita foi avaliada mediante a mensuração da relação Ca/P a partir das concentrações, em percentagem de peso, dos elementos Ca e P isoladamente. Os valores

médios encontrados para a relação Ca/P variaram de 1,92 ± 0,06 a 2,03 ± 0,04, menores que a relação molar da hidroxiapatita sintética, em porcentagem de peso, que é de 2,16. Esses resultados já eram esperados, visto que a fase inorgânica óssea é formada por uma apatita carbonatada pobremente cristalina não estequiométrica (Boivin; Meunier, 2003; Kourkoumelis; Tzaphlidou, 2010). Valores próximos aos verificados no presente trabalho, foram observados por Hu et al., 2002, que encontraram uma relação Ca/P de 1,96 ± 0,02 na mandíbula de caprinos. Segundo Zaichick e Tzaphlidou (2003), a análise da relação Ca/P, quando comparada às concentrações de Ca e P isoladamente, mostra menores valores de desvio padrão e coeficiente de variação, podendo ser mais confiável para o diagnóstico de desordens ósseas. No presente estudo, na maioria dos grupos experimentais, também foram observados menores valores de desvio padrão e coeficiente de variação para a relação Ca/P.

Estudos sugerem que, tanto o álcool quanto a deficiência estrogênica, podem afetar o osso alveolar e aumentar a suscetibilidade do hospedeiro à progressão da doença periodontal (Dervis, 2005; Amaral et al., 2008; Irie et al., 2008; Kuo et al., 2008). Em relação aos grupos com dieta livre, as concentrações de Ca, P e a relação Ca/P diminuíram significativamente quando o álcool foi associado à deficiência estrogênica. Além disto, o grupo Ovz álcool foi o único que apresentou diferença significativa nos valores da relação Ca/P, quando comparado ao controle que não recebeu tratamento (Sham dieta livre). Por outro lado, quando avaliado o grupo Sham álcool, não houve uma diminuição significativa da relação Ca/P em relação aos grupos com dieta livre, apenas a porcentagem de Ca foi estatisticamente menor quando comparada ao grupo Ovz dieta livre. Desta forma, nas condições deste experimento, uma significativa alteração na estequiometria da hidroxiapatita foi conseguida quando o álcool a 20% foi associado à deficiência estrogênica, o que não aconteceu com o consumo isolado de etanol. Um efeito aditivo do álcool, associado à ovariectomia, influenciando

negativamente a qualidade óssea, já havia sido observado por outros autores em vértebras (Callaci et al., 2006), na osseointegração de implantes de titânio (Deco, 2009) e nos tecidos periodontais (Alonso, 2009). Alonso (2009) verificou, mediante análises histológicas e histomorfométricas, uma exacerbação da perda óssea e do processo inflamatório, na crista óssea alveolar, em ratas ovariectomizadas que receberam etanol a 20%.

Os mecanismos moleculares e celulares que levariam ao efeito aditivo da deficiência estrogênica associada ao consumo excessivo de álcool ainda não estão bem esclarecidos. No entanto, ambas as condições têm sido isoladamente associadas a aumento da expressão de importantes citocinas consideradas osteoclastogênicas como IL-1, IL-6 e TNF-α. (Deviere et al., 1989; McClain; Cohen, 1989; Khoruts et al., 1991; Szabo, 1999; Lerner, 2006; Faloni; Cerri, 2007; Irie et al., 2008). Adicionalmente, é possível que também haja uma interferência na regulação da via RANK/RANKL OPG, mediante aumento da expressão de RANKL e diminuição de OPG (Faloni; Cerri, 2007; Callaci et al., 2009; Folkestad et al., 2009; Horner, 2009). Outros trabalhos poderiam observar a expressão destas proteínas e a possível influência das mesmas na composição química da fase inorgânica óssea, quando o álcool estiver associado à deficiência estrogênica. Deve-se considerar, também, o possível efeito tóxico do consumo excessivo de álcool sobre a atividade osteoblástica, o que poderia contribuir como fator adicional, para alterações no processo de mineralização na região (Chakkalakal, 2005; Rosa et al., 2008).

Teoricamente, esperava-se que nos animais ovariectomizados, em função da deficiência estrogênica, houvesse tendência à diminuição nas porcentagens de minerais tais como Ca e P, devido ao aumento do processo de remodelação óssea, com predomínio da reabsorção e decréscimo da densidade mineral (Burnell et al., 1982; Meunier; Boivin, 1997; Boivin; Meunier, 2003; Lerner, 2006). Isto

realmente aconteceu com os animais ovariectomizados que foram submetidos a um controle dietético (Ovz álcool e Ovz isocalórico). No entanto, não ocorreu com os animais ovariectomizados que receberam dieta livre, grupo no qual foram observados os maiores valores na relação Ca/P. Yan et al. (2010) verificaram, em um estudo piloto, que maiores valores na relação Ca/P, podem estar relacionados a um aumento dos índices de regeneração periodontal em defeitos de furca previamente criados, e associaram estes achados, a uma melhoria da qualidade óssea.

Deve-se notar que o grupo Ovz dieta livre apresentou características interessantes que o diferenciou dos demais, pois foi o que mais ganhou peso e também foi o que mais consumiu ração. Outros autores também verificaram um aumento no peso corporal em animais ovariectomizados, quando comparados a grupos Sham operados (Richard et al., 1987; Kimura et al., 2002; Vasconcellos et al., 2004; Alonso, 2009; Deco, 2009; Senra, 2009; Zoth et al., 2010). Se por um lado a ovariectomia aumenta a ingestão de alimentos e o ganho de peso, pesquisas demonstram que o tratamento com estradiol reverte estes efeitos (Richard, 1986; Richard et al., 1987; Guyard et al., 1991). Estudos com animais *knockout* verificaram que o estrogênio pode ser importante para a manutenção da homeostase lipídica (Heine et al., 2000; Jones et al., 2000). Animais deficientes para receptores para estrogênio do tipo α apresentavam hiperplasia e hipertrofia de adipócitos, resistência insulínica e intolerância à glicose (Heine et al., 2000) e os deficientes para a aromatase, enzima responsável pela biossíntese de estrogênio apresentaram aumento da adiposidade abdominal, do volume dos adipócitos, hiperleptinemia, hiperinsulinemia e hipercolesterolemia (Jones et al., 2000).

Os resultados deste experimento não permitem elucidar de forma clara quais motivos levaram a obtenção de maiores valores na relação Ca/P, nos animais ovariectomizados que receberam dieta livre,

em relação aos demais grupos submetidos à deficiência estrogênica. No entanto, uma possível explicação pode estar associada ao fato dos animais terem consumido significativamente mais ração que os com controle dietético. Há evidências de que o exercício físico possa estar relacionado a um aumento da densidade óssea mineral em mulheres após a menopausa (Bonaiuti et al., 2002). Da mesma forma, é possível que, com o aumento da ingestão de ração, a maior incidência de forças mastigatórias sobre o osso alveolar tenha alterado localmente o metabolismo ósseo na região. Patullo et al. (2009) sugerem que a hipofunção mastigatória, com consequente diminuição da intensidade das forças oclusais, poderia estar relacionada a uma diminuição da massa óssea e a efeitos deletérios sobre a qualidade do osso mandibular.

Adicionalmente, o maior consumo de ração por parte do grupo Ovz dieta livre, levou a um maior aporte de nutrientes importantes para manutenção da qualidade óssea, incluindo Ca e P (Miggiano; Gagliardi, 2005; Bonjour et al., 2009), o que poderia ajudar a entender os elevados valores na relação Ca/P. Outra explicação pode estar na influência do ganho de peso sobre o tecido ósseo. Alguns pesquisadores sugerem que, após a menopausa, mulheres com sobrepeso conservam melhor a massa óssea se comparadas às mais magras (Cifuentes et al., 2003; Shapses; Riedt, 2006; Petzel, 2007). A leptina, uma citocina secretada por células adiposas, tem sido estudada como potencial moduladora dos efeitos protetores do tecido adiposo sobre os ossos (Petzel, 2007).

No entanto, é importante salientar que, apesar do grupo Ovz dieta livre ter apresentado os maiores valores médios na relação Ca/P, estatisticamente diferente dos demais grupos ovariectomizados (Ovz álcool e Ovz isocalórico), ele não foi diferente do Sham dieta livre. Desta forma, não foi possível afirmar que, em relação a animais não tratados, houve alteração da estequiometria da hidroxiapatita, quando a deficiência estrogênica foi associada à dieta livre.

Alguns autores sugerem que alterações na dieta possam interferir na resposta do hospedeiro à progressão da doença periodontal (Enwonwu; Ritchie, 2007; Chapple, 2009; Jenzsch et al., 2009; Reynolds et al., 2009). Possivelmente, isto está relacionado ao fato de que processos inflamatórios crônicos provocam stress oxidativo, com aumento da demanda por uma dieta rica em minerais e vitaminas antioxidantes (Enwonwu; Ritchie, 2007; Chapple, 2009). No presente trabalho, os animais dos grupos isocalóricos tiveram uma significativa diminuição das porcentagens de Ca e P se comparados a ambos os grupos com dieta livre, e da relação Ca/P, se comparados ao grupo Ovz dieta livre. Os efeitos da restrição dietética também foram verificados por outros autores. Reddy Nagareddy e Lakshmana (2005) observaram uma diminuição da relação Ca/P no fêmur de animais ovariectomizados que receberam uma dieta deficiente em Ca, se comparados ao Sham operados com dieta livre. Uma possível relação entre dietas deficientes em Ca, aumento da inflamação, perda óssea alveolar e maior risco de desenvolvimento da doença periodontal também têm sido proposta na literatura. (Hildebolt, 2005). Apesar de não termos oferecido aos animais uma ração deficiente em Ca, o menor consumo de ração nos grupos com controle dietético, diminuiu o aporte deste e de outros nutrientes, em relação aos grupos com dieta livre.

No presente estudo, verificamos também, que os menores valores médios na relação Ca/P e nas concentrações de Ca e P isoladamente, foram obtidos nos grupos com controle dietético (Ovz álcool, Ovz isocalórico, Sham álcool e Sham isocalórico), e os maiores, nos grupos com dieta livre. Estes achados reforçam a idéia de que a dieta pode ter tido um papel importante nas variações estequiométricas da hidroxiapatita encontradas neste experimento. No entanto, mais estudos são necessários para que esta afirmação tenha uma maior confiabilidade estatística, já que, no que se refere à relação Ca/P, apenas o grupo Ovz álcool foi estatisticamente diferente de ambos os grupos com dieta livre.

A qualidade da dieta também pode interferir na resposta do hospedeiro à doença periodontal. Neste experimento, os animais dos grupos isocalóricos receberam uma solução de sacarose, o que pode ter influenciado parcialmente os resultados, visto que, dietas ricas em carboidratos refinados, têm sido associadas a respostas hiperinflamatórias, o que poderia aumentar a suscetibilidade do hospedeiro ao desenvolvimento da doença periodontal (Chapple, 2009).

Diferentemente do que foi proposto em outros trabalhos, neste experimento, não foi realizada indução de doença periodontal por ligadura (Souza et al., 2006; Irie et al., 2008; Alonso, 2009). Este desenho experimental levou em consideração resultados previamente observados por Irie et al. (2008), os quais verificaram que o consumo isolado de etanol, mesmo sem a indução da doença periodontal, foi capaz de causar migração apical do epitélio juncional, reabsorção óssea alveolar, maior infiltração de leucócitos polimorfonucleares, aumento do dano oxidativo e exacerbação da produção de TNF-α.

Uma das limitações deste trabalho foi de não ter conseguido que os animais do grupo isocalórico ingerissem exatamente a mesma quantidade de kcal do grupo álcool quando considerada a ingestão de líquidos. Assim, o grupo isocalórico ingeriu menor volume de sacarose se comparado ao grupo álcool, o que fez com que o primeiro grupo tivesse uma dieta ainda mais restrita em calorias se comparado ao segundo. Mudanças na inclinação dos bebedouros ou alterações na forma de administração da dieta líquida poderiam ser consideradas em futuros estudos. Por outro lado, em relação à alimentação sólida, que propiciou o aporte nutricional de Ca e P, o objetivo deste trabalho foi plenamente alcançado, pois os animais dos grupos isocalóricos ingeriram a mesma quantidade de ração dos grupos álcool.

Este é um estudo inovador, já que na revisão de literatura deste trabalho, não foram encontradas outras pesquisas que se propusessem a verificar as concentrações de Ca e P, especificamente na

região da crista óssea alveolar, o que dificulta a interpretação dos resultados do ponto de vista clínico, histológico ou molecular. Desta forma, mais pesquisas são necessárias para estabelecer com confiabilidade a aplicação destes resultados. Novos trabalhos, já em andamento nos laboratórios Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, em ratas que receberam o mesmo tratamento proposto neste estudo, pretendem elucidar, utilizando ferramentas histológicas e imunoistoquímicas um pouco mais a respeito do assunto.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados possibilitou concluir que, em ratas, a ovariectomia associada ao consumo de álcool a 20%, levou a uma alteração na estequiometria da hidroxiapatita, caracterizada por significativa diminuição da relação Ca/P, na região da crista óssea alveolar.

8 REFERÊNCIAS*

Alonso JMSL. Influência do consumo crônico de etanol 20% na doença periodontal induzida em ratas com deficiência estrogênica [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP - Univ Estadual Paulista; 2009.

Alvisa-Negrín J, González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, García-Valdecasas-Campelo E, Valls MR, Pelazas-González R, et al. Osteopenia in alcoholics: effect of alcohol abstinence. Alcohol Alcohol. 2009 Sep-Oct;44(5):468-75.

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

Anbinder AL, Prado MA, Spalding M, Balducci I, Carvalho YR, da Rocha RF. Estrogen deficiency and periodontal condition in rats: a radiographic and macroscopic study. Braz Dent J. 2006;17(3):201-7.

Arnold WH, Gaengler P. Quantitative analysis of the calcium and phosphorus content of developing and permanent human teeth. Ann Anat. 2007;189(2):183-90.

Berg KM, Kunins HV, Jackson JL, Nahvi S, Chaudhry A, Harris KA, et al. Association between alcohol consumption and both osteoporotic fracture and bone density. Am J Med. 2008 May;121(5):406-18. Review.

---

*Baseado em:
International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Boivin G, Meunier PJ. The mineralization of bone tissue: a forgotten dimension in osteoporosis research. Osteoporos Int. 2003;14 Suppl 3:S19-24. Review.

Bonaiuti D, Shea B, Iovine R, Negrini S, Robinson V, Kemper HC, et al. Exercise for preventing and treating osteoporosis in postmenopausal women. Cochrane Database Syst Rev. 2002;(3):CD000333. Review.

Bonjour JP, Guéguen L, Palacios C, Shearer MJ, Weaver CM. Minerals and vitamins in bone health: the potential value of dietary enhancement. Br J Nutr. 2009 Jun;101(11):1581-96. Review.

Boonen S, Singer AJ. Osteoporosis management: impact of fracture type on cost and quality of life in patients at risk for fracture I. Curr Med Res Opin. 2008 Jun;24(6):1781-8. Review.

Broulik PD, Rosenkrancová J, Růžička P, Sedláček R, Zíma T. The effect of chronic alcohol administration on bone mineral content and bone strength in male rats. Physiol Res. 2009 Nov 20. [Epub ahead of print]

Burnell JM, Baylink DJ, Chestnut CH 3rd, Mathews MW, Teubner EJ. Bone matrix and mineral abnormalities in postmenopausal osteoporosis. Metabolism. 1982 Nov;31(11):1113-20.

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

Callaci JJ, Juknelis D, Patwardhan A, Wezeman FH. Binge alcohol treatment increases vertebral bone loss following ovariectomy: Compensation by intermittent parathyroid hormone. Alcohol Clin Exp Res. 2006;30(4):665-72.

Carlini EA, Galduróz JCF, Silva AAB, Noto AR, Fonseca AM, Carlini CM, et al. II levantamento domiciliar sobre uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 108 maiores cidades do país: 2005. São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: Universidade Federal de São Paulo; 2006.

Carlini EA, Galduróz JCF, Noto AR, Nappo SA. I levantamento domiciliar sobre uso de drogas psicotrópicas no Brasil: estudo envolvendo as 107 maiores cidades do país: 2001. São Paulo: Centro Brasileiro de Informações sobre Drogas Psicotrópicas: Universidade Federal de São Paulo; 2002.

Carvalho FG, Puppin-Rontani RM, Soares LE, Santo AM, Martin AA, Nociti-Junior FH. Mineral distribution and CLSM analysis of secondary caries inhibition by fluoride/MDPB-containing adhesive system after cariogenic challenges. J Dent. 2009 Apr;37(4):307-14.

Chakkalakal DA. Alcohol-induced bone loss and deficient bone repair. Alcohol Clin Exp Res. 2005;29(12):2077-90. Review.

Chapple IL. Potential mechanisms underpinning the nutritional modulation of periodontal inflammation. J Am Dent Assoc. 2009 Feb;140(2):178-84. Review.

Ciarelli TE, Fyhrie DP, Parfitt AM. Effects of vertebral bone fragility and bone formation rate on the mineralization levels of cancellous bone from white females. Bone. 2003 Mar;32(3):311-5.

Cifuentes M, Johnson MA, Lewis RD, Heymsfield SB, Chowdhury HA, Modlesky CM, et al. Bone turnover and body weight relationships differ in normal-weight compared with heavier postmenopausal women. Osteoporos Int. 2003 Apr;14(2):116-22.

Ciobanu G, Carja G, Ciobanu O, Sandu I, Sandu A. SEM and EDX studies of bioactive hydroxyapatite coatings on titanium implants. Micron. 2009 Jan;40(1):143-6.

Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol. 2008 Nov;3 Suppl 3:S131-9. Review.

Cole ZA, Dennison EM, Cooper C. Osteoporosis epidemiology update. Curr Rheumatol Rep. 2008;10(2):92-6. Review.

Cummings SR, Tice JA, Bauer S, Browner WS, Cuzick J, Ziv E, et al. Prevention of Breast Cancer in Postmenopausal Women: Approaches to Estimating and Reducing Risk. J Natl Cancer Inst. 2009 Mar;101(6):384-98. Review.

Deco CP. Influência da osteoporose e álcool na osseointegração de implantes em ratas [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP - Univ Estadual Paulista; 2009.

Dervis E. Oral implications of osteoporosis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;100(3):349-56. Review.

Deviere J, Content J, Denys C, Vandenbussche P, Schandene L, Wybran J, et al. High interleukin-6 serum levels and increased production by leucocytes in alcoholic liver cirrhosis. Correlation with IgA serum levels and lymphokines production. Clin Exp Immunol. 1989 Aug;77(2):221-5.

Duarte PM, Assis DR, Casati MZ, Sallum AW, Sallum EA, Nociti FH Jr. Alendronate may protect against increased periodontitis-related bone loss in estrogen-deficient rats. J Periodontol. 2004 Sep;75(9):1196-202.

Dvorak G, Reich K, Tangl S, Lill CA, Gottschalk-Baron M, Watzek G, et al. Periodontal histomorphometry and status of aged sheep subjected to ovariectomy, malnutrition and glucocorticoid application. Arch Oral Biol. 2009 Sep;54(9):857-63.

Elsubeihi ES, Heersche JNM. Effects of postmenopausal osteoporosis on the mandible. In: Zarb G, Lekholm U, Albrektsson T, Tenenbaum H, editors. Aging, osteoporosis, and dental implants. Chicago: Quintessence Publishing; 2002. p. 207-15.

Enwonwu CO. Differential sex effects of nutritional status on inflammatory periodontal disease in non-human primates. Nutrition. 2010 Jan;26(1):139; author reply 140. Comment on: Nutrition. 2009 Jan;25(1):88-97.

Enwonwu CO, Ritchie CS. Nutrition and inflammatory markers. J Am Dent Assoc. 2007 Jan;138(1):70-3. Review.

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

Faloni APS, Cerri PS. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. Rev Odont UNESP. 2007;36(2):181-8.

Folkestad L, Bjarnason NH, Bjerregaard JK, Brixen K. The effect of aromatase inhibitors on bone metabolism. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2009 Jan;104(1):3-10. Review.

Fountos G, Tzaphlidou M, Kounadi E, Glaros D. In vivo measurement of radius calcium/phosphorus ratio by X-ray absorptiometry. Appl Radiat Isot. 1999;51(3):273-8.

Frazão P, Naveira M. Prevalência de osteoporose: uma revisão crítica. Rev bras epidemiol. 2006;9(2):206-14.

Galduróz JCF, Caetano R. Epidemiology of alcohol use in Brazil. Rev Bras Psiquiatr. 2004;26 Suppl 1:3-6.

Geurs NC. Osteoporosis and periodontal disease. Periodontol 2000. 2007;44:29-43. Review.

Ginsburg ES, Mello NK, Mendelson JH, Barbieri RL, Teoh SK, Rothman M, et al. Effects of alcohol ingestion on estrogens in postmenopausal women. JAMA. 1996;276(21):1747-51.

Guyard B, Fricker J, Brigant L, Betoulle D, Apfelbaum M. Effects of ovarian steroids on energy balance in rats fed a highly palatable diet. Metabolism. 1991 May;40(5):529-33.

Halade GV, Rahman MM, Williams PJ, Fernandes G. High fat diet-induced animal model of age-associated obesity and osteoporosis. J Nutr Biochem. 2010 Feb 9. [Epub ahead of print]

Heaney RP. Dairy and bone health. J Am Coll Nutr. 2009 Feb;28 Suppl 1:82S-90S. Review.

Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 7;97(23):12729-34.

Hildebolt CF. Effect of vitamin D and calcium on periodontitis. J Periodontol. 2005 Sep;76(9):1576-87.

Hogan HA, Argueta F, Moe L, Nguyen LP, Sampson HW. Adult-onset alcohol consumption induces osteopenia in female rats. Alcohol Clin Exp Res. 2001;25(5):746-54.

Horner KC. The effect of sex hormones on bone metabolism of the otic capsule-an overview. Hear Res. 2009 Jun;252(1-2):56-60. Review.

Hu J, Li J, Wang D, Buckley MJ, Agarwal S. Differences in mandibular distraction osteogenesis after corticotomy and osteotomy. Int J Oral Maxillofac Surg. 2002. Apr;31(2):185-9.

Irie K, Tomofuji T, Tamaki N, Sanbe T, Ekuni D, Azuma T, et al. Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. J Dent Res. 2008;87(5):456-60.

Jenzsch A, Eick S, Rassoul F, Purschwitz R, Jentsch H. Nutritional intervention in patients with periodontal disease: clinical, immunological and microbiological variables during 12 months. Br J Nutr. 2009 Mar;101(6):879-85.

Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, et al. Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 7;97(23):12735-40.

Jugdaohsingh R, O'Connell MA, Sripanyakorn S, Powell JJ. Moderate alcohol consumption and increased bone mineral density: potential ethanol and non-ethanol mechanisms. Proc Nutr Soc. 2006 Aug;65(3):291-310. Review.

Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JI. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. Hepatology. 1991 Feb;13(2):267-76.

Kidder LS, Turner RT. Dietary ethanol does not accelerate bone loss in ovariectomized rats. Alcohol Clin Exp Res. 1998;22(9):2159-64.

Kim J, Amar S. Periodontal disease and systemic conditions: a bidirectional relationship. Odontology. 2006 Sep;94(1):10-21. Review.

Kimura M, Irahara M, Yasui T, Saito S, Tezuka M, Yamano S, et al. The obesity in bilateral ovariectomized rats is related to a decrease in the expression of leptin receptors in the brain. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Feb 1;290(4):1349-53.

Kourkoumelis N, Tzaphlidou M. Spectroscopic assessment of normal cortical bone: differences in relation to bone site and sex. ScientificWorldJournal. 2010 Mar 5;10:402-12.

Kuhn LT, Grynpas MD, Rey CC, Wu Y, Ackerman JL, Glimcher MJ. A comparison of the physical and chemical differences between cancellous and cortical bovine bone mineral at two ages. Calcif Tissue Int. 2008 Aug;83(2):146-54. Erratum in: Calcif Tissue Int. 2009 Apr;84(4):335.

Kuo LC, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. Public Health. 2008;122(4):417-33. Review.

Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. J Dent Res. 2006;85(7):584-95. Review.

Lieber CS. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. Mt Sinai J Med. 2000 Jan;67(1):84-94.

Liu ZP, Li WX, Yu B, Huang J, Sun J, Huo JS, et al. Effects of trans-resveratrol from Polygonum cuspidatum on bone loss using the ovariectomized rat model. J Med Food. 2005 Spring;8(1):14-9.

Macdonald HM, New SA, Golden MH, Campbell MK, Reid DM. Nutritional associations with bone loss during the menopausal transition: evidence of a beneficial effect of calcium, alcohol, and fruit and vegetable nutrients and of a detrimental effect of fatty acids. Am J Clin Nutr. 2004 Jan;79(1):155-65.

Maliska AM. Microscopia eletrônica de varredura [apostila]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Mecânica. Acesso em 18/05/2010. Disponível em: http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf

McClain CJ, Cohen DA. Increased tumor necrosis factor production by monocytes in alcoholic hepatitis. Hepatology. 1989 Mar;9(3):349-51.

Meunier PJ, Boivin G. Bone mineral density reflects bone mass but also the degree of mineralization of bone: therapeutic implications. Bone. 1997 Nov;21(5):373-7. Review.

Miggiano GA, Gagliardi L. [Diet, nutrition and bone health]. Clin Ter. 2005 Jan-Apr;156(1-2):47-56. Review. Italian.

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

Moffat KL, Sun WHS, Pena PE, Chahine NO, Doty SB, Ateshian GA, et al. Characterization of the structure-function relationship at the ligament-to-bone interface. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jun 10;105(23):7947-52.

Moreno Otero R, Cortés JR. [Nutrition and chronic alcohol abuse]. Nutr Hosp. 2008 May;23 Suppl 2:3-7. Spanish.

National Osteoporosis Foundation. Advocacy news & updates. [home page on the internet]. [cited 2010 May 18]. Available from: http://www.nof.org/advocacy/prevalence/index.htm

Nicopoulou-Karayianni K, Tzoutzoukos P, Mitsea A, Karayiannis A, Tsiklakis K, Jacobs R, et al. Tooth loss and osteoporosis: the osteodent study. J Clin Periodontol. 2009 Mar;36(3):190-7.

Oliveira R, Santo AME, Soares LES, Martins AA. Avaliação dos componentes inorgânicos da dentina após condicionamento para procedimentos adesivos por fluorescência de raios-X. Exacta. 2009;6:139-46.

Patullo IM, Takayama L, Patullo RF, Jorgetti V, Pereira RM. Influence of ovariectomy and masticatory hypofunction on mandibular bone remodeling. Oral Dis. 2009 Nov;15(8):580-6.

Peng ZQ, Väänänen HK, Zhang HX, Tuukkanen J. Long-term effects of ovariectomy on the mechanical properties and chemical composition of rat bone. Bone. 1997 Mar;20(3):207-12.

Pereira SRM, Mendonça LMC. Osteoporose e osteomalacia. In: Freitas EV, Py L, Cançado FAX, Doll J, Gorzoni ML, editors. Tratado de geriatria e gerontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006. p. 798-814.

Petzel M. Action of leptin on bone and its relationship to menopause. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2007 Dec;151(2):195-9. Review.

Pizzo G, Lo Re D, Piscopo MR, Pizzo I, Giuliana G. Genetic disorders and periodontal health: a literature review. Med Sci Monit. 2009 Aug;15(8):167-78. Review.

Purohit V. Moderate alcohol consumption and estrogen levels in postmenopausal women: A review. Alcohol Clin Exp Res. 1998 Aug;22(5):994-7. Review.

Reddy Nagareddy P, Lakshmana M. Assessment of experimental osteoporosis using CT-scanning, quantitative X-ray analysis and impact test in calcium deficient ovariectomized rats. J Pharmacol Toxicol Methods. 2005 Nov-Dec;52(3):350-5.

Reynolds MA, Dawson DR, Novak KF, Ebersole JL, Gunsolley JC, Branch-Mays GL, et al. Effects of caloric restriction on inflammatory periodontal disease. Nutrition. 2009 Jan;25(1):88-97.

Richard D. Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. Am J Physiol. 1986 Feb;250(2 Pt 2):R245-9.

Richard D, Rochon L, Deshaies Y. Effects of exercise training on energy balance of ovariectomized rats. Am J Physiol. 1987 Nov;253(5 Pt 2):R740-5. Erratum in: Am J Physiol 1988 Apr;254(4 Pt 2):preceding R567. Denis R [corrected to Richard D].

Rocha RF. Influência do consumo de álcool no fêmur de ratos machos e fêmeas [tese de livre docência]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP - Univ Estadual Paulista; 2005.

Rosa ML, Beloti MM, Prando N, Queiroz RHC, de Oliveira PT, Rosa AL. Chronic ethanol intake inhibits in vitro osteogenesis induced by osteoblasts differentiated from stem cells. J Appl Toxicol. 2008;28(2):205-11.

Sampson HW. Alcohol, osteoporosis, and bone regulating hormones. Alcohol Clin Exp Res. 1997;21(3):400-3. Review.

Sampson HW, Shipley D. Moderate alcohol consumption does not augment bone density in ovariectomized rats. Alcohol Clin Exp Res. 1997;21(7):1165-8.

Senra GS. Avaliação da qualidade óssea no reparo de defeitos ósseos sob a ação do risedronato e da deficiência estrogênica [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP - Univ Estadual Paulista; 2009.

Shapses SA, Riedt CS. Bone, body weight, and weight reduction: what are the concerns? J Nutr. 2006 Jun;136(6):1453-6. Review.

Souza DM, Ricardo LH, Prado MA, Prado FA, Rocha RF. The effect of alcohol consumption on periodontal bone support in experimental periodontitis in rats. J Appl Oral Sci. 2006;14(6):443-7.

Suvorova EI, Petrenko PP, Buffat PA. Scanning and transmission electron microscopy for evaluation of order/disorder in bone structure. Scanning. 2007 Jul-Aug;29(4):162-70.

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

Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. J Periodontal Res. 2005 Aug;40(4):287-93. Review.

Tanaka S, Shimizu M, Debari K, Furuya R, Kawawa T, Sasaki T. Acute effects of ovariectomy on wound healing of alveolar bone after maxillary molar extraction in aged rats. Anat Rec. 2001 Feb 1;262(2):203-12.

Taubman MA, Valverde P, Han X, Kawai T. Immune response: the key to bone resorption in periodontal disease. J Periodontol. 2005 Nov;76(11 Suppl):2033-41. Review.

Templeton K. Secondary osteoporosis. J Am Acad Orthop Surg. 2005 Nov;13(7):475-86. Review.

Todd AC, Chettle DR. In vivo X-ray fluorescence of lead in bone: review and current issues. Environ Health Perspect. 1994 Feb;102(2):172-7. Review.

Tucker KL, Jugdaohsingh R, Powell JJ, Qiao N, Hannan MT, Sripanyakorn S, et al. Effects of beer, wine, and liquor intakes on bone mineral density in older men and women. Am J Clin Nutr. 2009 Apr;89(4):1188-96.

Turner RT. Skeletal response to alcohol. Alcohol Clin Exp Res. 2000;24(11):1693-701. Review.

Tzaphlidou M, Speller R, Royle G, Griffiths J. Preliminary estimates of the calcium/phosphorus ratio at different cortical bone sites using synchrotron microCT. Phys Med Biol. 2006 Apr 7;51(7):1849-55.

Vasconcellos LS, Leite JM, Sabino KR, Petroianu A. Influência da ooforectomia na variação ponderal em ratas jovens e adultas. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2004 Apr;48(2):299-304.

Wikipedia. Energy-dispersive X-ray spectroscopy [home page on the internet]. [updated 2010 May 13; cited 2010 May 18]. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Energy-dispersive_X-ray_spectroscopy

Yan XZ, Ge SH, Sun QF, Guo HM, Yang PS. A Pilot Study Evaluating the Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and Recombinant Human Beta-Nerve Growth Factor on the Healing of Class III Furcation Defects in Dogs. J Periodontol. 2010 Sep;81(9):1289-98.

Yoshinari N, Kawase H, Noguchi T. [The relationship between periodontal disease and osteoporosis in animals]. Clin Calcium. 2006;16(2):279-86. Japanese.

Zaichick V, Tzaphlidou M. Calcium and phosphorus concentrations and the calcium/phosphorus ratio in trabecular bone from the femoral neck of healthy humans as determined by neutron activation analysis. Appl Radiat Isot. 2003 Jun;58(6):623-7.

Zhou H, Shang L, Li X, Zhang X, Gao G, Guo C, et al. Resveratrol augments the canonical Wnt signaling pathway in promoting osteoblastic differentiation of multipotent mesenchymal cells. Exp Cell Res. 2009 Oct 15;315(17):2953-62.

Zoth N, Weigt C, Laudenbach-Leschowski U, Diel P. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. J Steroid Biochem Mol Biol. 2010 Oct;122(1-3):100-5.

ANEXO A – Certificado do comitê de ética

unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – São Dimas – CEP 12201-970 – F (12) 3947-9000 – FAX (12) 3947-9028 –

Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Animais

São José dos Campos, 22 de fevereiro de 2010

Ofício nº 01/10-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	**ADRIANA MATHIAS PEREIRA DA SILVA MARCHINI**
Projeto	Influência do consumo de álcool e da deficiência estrogênica na mandíbula de ratas

PARECER

Por solicitação da Pesquisadora Responsável, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, para "**Influência do alcoolismo crônico e da deficiência estrogênica sobre a variação de estequeiometria da hidroxiapatia na crista óssea alveolar de ratas** " Convalidando dessa forma o Protocolo nº 021/2008-PA/CEP de 12/11/2008

Atenciosamente,

Profa. Titular YASMIN RODARTE CARVALHO
Coordenadora

Marchini AMPS. Influence of chronic alcoholism and estrogen deficiency on the variation of stoichiometry of hydroxyapatite within alveolar bone crest of rats (dissertation). São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2010.

ABSTRACT

Bones are composed of mineralized tissue constituting mainly of calcium (Ca) and phosphorous (P). These elements are organised forming crystals of hydroxyapatite. Some conditions or pathologies affecting this tissue, may alter the quantitative distribution (or presence) of these elements; and consequently the stoichiometric composition of hydroxyapatite. Recent studies suggest that chronic alcoholism as well as estrogenic deficiencies may affect bones in general (including alveolar bone), and in doing so increases individuals' susceptibility in developing progressive periodontal disease. The main objective of this research was to verify possible alterations in Ca/P ratios (in the alveolar bone crest region), in laboratory rats subjected to chronic alcoholism and/or estrogen deficiency induced by ovariectomy. Fifty four rats (Rattus norvegicus, of the albinus, Wistar variety), were initially divided into two groups: ovariectomized (Ovz), and Sham operated (Sham). A month after surgery the two groups were sub-divided (according to their diet), and received the following dietary intervention: (a) alcohol at 20%, (b) isocaloric diet and (c) free diet. Eight weeks after the commencement of the dietetic treatment, the animals were sacrificed and their jaws removed. Samples were then cut in a longitudinal direction, in the alveolar bone crest region (between the first and second molar), in order to verify Ca and P concentrations and Ca/P ratios using micro-fluorescence X ray spectrometry (EDX). Data obtained with spectrometry were evaluated by analysis of variance (ANOVA) and Tukey tests with significance levels of 5%. The free diet groups presented the highest average values of Ca/P ratios, and the groups with diet restrictions presented the smallest average values. The Ovz free diet group was the group with the greatest weight gain, a greater consumption of food volume and presented highest values of Ca/P ratios (average of 2.03 ± 0.04). These values were not, however, considered statistically different ($p>0.05$) from the free diet Sham group (average of 2.01 ± 0.01). The alcohol Ovz group presented lower values for Ca/P ratio (average of 1.92 ± 0.06), being the only group statistically different ($p<0.001$) from the free diet Sham group. From the results, it can be concluded that ovariectomy in association with alcohol consumption at 20%, significantly alters the stoichiometry of hydroxyapatite; leading to a reduction of Ca/P ratios.

Keywords: Alcoholism. Ovariectomy. Osteoporosis. Periodontium. Fluorescence Spectrometry. Calcium. Phosphorous.