Associação entre ingestão de álcool e periodontite experimental em ratas fêmeas

Association between alcohol intake and experimental periodontitis in female rats

Daniela Martins de Souza[1], Rosilene Fernandes da Rocha[2]

RESUMO

Introdução: O consumo de bebidas alcoólicas vem sendo associado à ocorrência e gravidade da doença periodontal. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do consumo de álcool sobre o suporte ósseo periodontal remanescente (SOP) em periodontite induzida por ligaduras em ratas. **Métodos:** Sessenta ratas fêmeas foram divididas em cinco grupos de 12 animais. Controle normal (água), Teste A (baixa dose de etanol), Controle A (baixa dose isocalórica), Teste B (alta dose de etanol) e Controle B (alta dose isocalórica). Os grupos Controle A e B receberam dietas com a mesma quantidade de calorias consumidas por Teste A e B respectivamente, com o etanol substituído por carboidrato. Após 4 semanas do início do experimento, ligaduras de algodão foram posicionadas no primeiro molar inferior direito em seis ratas por grupo. As outras seis ratas por grupo permaneceram sem ligadura. Totalizando oito semanas experimentais, as ratas foram sacrificadas e as mandíbulas radiografadas para medição do SOP. **Resultados:** A análise entre os grupos com e sem ligadura demonstrou que a presença da ligadura foi capaz de induzir perda óssea ($p<0,05$). Os grupos sem ligadura não demonstraram diferença significativa no SOP ($p>0,05$) entre eles. Contudo, nos grupos com ligadura, as ratas que receberam altas doses de etanol apresentaram percentual de SOP estatisticamente inferior aos outros grupos ($p<0,05$). **Conclusão:** O presente estudo demonstrou que o elevado consumo de álcool pode agravar a progressão da perda óssea alveolar resultante de periodontite induzida por ligadura em ratas fêmeas.

UNITERMOS: Etanol, Perda Óssea Alveolar, Periodontite.

ABSTRACT

Introduction: *The consumption of alcoholic beverages has been associated with the occurrence and severity of periodontal disease. The aim of this study was to evaluate the effect of alcohol consumption on remaining periodontal bone support (PBS) in periodontitis induced by ligation in female rats.* **Methods:** *Sixty female rats were divided into five groups of 12 animals each: Normal Control (water),Test A (low dose of ethanol), Control A (low isocaloric dose), Test B (high dose of ethanol) and Control B (high isocaloric dose). Control Groups A and B received diets with the same amount of calories consumed by Test Groups A and B, respectively, with ethanol replaced by carbohydrate. Four weeks after the beginning of the experiment, cotton ligatures were placed on the lower right first molar in six rats per group. The other six rats per group remained unligated. After 8 experimental weeks, the rats were sacrificed and their jaws x-rayed to measure the PBS.* ***Results:*** *The analysis between groups with and without ligation showed that the presence of ligation was able to induce bone loss ($p < 0.05$). The unligated groups showed no significant difference in the PBS ($p > 0.05$) between them. However, in the groups with the ligation, rats given high doses of ethanol had statistically lower percentage of PBS than the other groups ($p < 0.05$).* ***Conclusion:*** *This study showed that high consumption of alcohol may aggravate the progression of alveolar bone loss resulting from ligation-induced periodontitis in female rats..*

KEYWORDS: *Ethanol, Alveolar Bone Loss, Periodontitis.*

[1] Doutora em biopatologia bucal. Professora assistente de Odontologia. Faculdade de Pindamonhangaba e Universidade Estadual Paulista
[2] Livre-docente. Professora adjunta de Odontologia. Faculdade de Pindamonhangaba e Universidade Estadual Paulista

INTRODUÇÃO

A periodontite é uma doença infecciosa, na qual limitado número de bactérias específicas atuam como iniciadores da doença. Sua relação com os fatores de resposta do hospedeiro determinam sua ocorrência e severidade (1). A periodontite envolve a destruição da estrutura de suporte dos dentes, incluindo o ligamento periodontal, o osso alveolar e os tecidos gengivais (2). Há uma grande variedade de fatores que influenciam a progressão da periodontite, incluindo as características individuais, sociais, comportamentais, sistêmicas, genéticas, dentárias e a composição microbiana do biofilme dentário (3, 4). Os fatores sociais e comportamentais incluem o hábito de fumar, o status socioeconômico, o status nutricional, os fatores psicológicos e o consumo excessivo de álcool (3).

Estudos que têm avaliado os efeitos do alcoolismo nos tecidos bucais sugerem que ele possa estar associado com maior risco para o desenvolvimento de problemas periodontais devido à pobre higiene oral (5, 6). Entretanto, existem evidências de que o abuso persistente do álcool afeta a severidade da doença periodontal, quando mensurados os níveis sanguíneos de gama-glutamil transpeptidase (GGTP), indicador enzimático do fígado de consumo de álcool (7). Estudos populacionais empregando questionário autorreportado, no que diz respeito ao consumo de álcool, sugerem sua associação com aumento da severidade da doença periodontal em humanos (8, 9). Entretanto, recentes estudos em humanos não demonstraram relação entre doença periodontal e ingestão de etanol (10, 11).

Em periodontia, modelos animais têm sido utilizados para compreensão dos fenômenos envolvidos no processo de etiopatogenia da doença (12) e para avaliar modalidades de tratamento (13). Além disso, são empregados para verificar a influência de fatores/indicadores de risco como a nicotina (14), diabete (15) e álcool (16,17) na progressão da doença periodontal.

Diante do fato do consumo de bebidas alcoólicas ser aceito socialmente e habitual para alguns indivíduos, torna-se importante sua correlação com alterações fisiológicas e a ocorrência de patologias na cavidade bucal. Na odontologia, verifica-se a necessidade da contribuição de mais estudos que testem a associação da ingestão alcoólica com a doença periodontal. O propósito deste estudo foi avaliar o efeito do consumo do álcool sobre o suporte ósseo periodontal (SOP) em periodontite induzida em ratas fêmeas.

MÉTODOS

Animais

O presente estudo utilizou sessenta ratas Wistar fêmeas, com quatro meses de idade e pesando em média 270g. Todas as ratas foram localizadas em condições similares e receberam dietas específicas de acordo com o grupo experimental. Este estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOSJC/UNESP sob o protocolo número 026/2003- PA/CEP.

Grupos experimentais

As ratas foram divididas aleatoriamente em cinco grupos de doze animais cada. O Grupo Controle normal (água); Teste A: baixa dose de etanol (10% de etanol); Controle A: baixa dose isocalórica (etanol substituído por isocalóricas quantidades de carboidrato consumidas pelo Teste A); Teste B: alta dose de etanol (20% de etanol) e Controle B: alta dose isocalórica (etanol substituído por isocalóricas quantidades de carboidrato consumidas pelo Teste B).

Todos os grupos foram alimentados com ração (Guabi Nutrilabor – Mogiana Alimentos – Campinas, SP, Brasil) que apresenta energia média metabolizável de 2,7 kcal/g. Utilizou-se balança digital (Micronal B600 – São Paulo, SP, Brasil) para registro das quantidades (g) iniciais e restantes de ração fornecida por gaiola diariamente.

Nos grupos Teste A e B, administrou-se álcool etílico absoluto (Ecibraâ – CETUS – Santo Amaro, SP, Brasil) diluído em água filtrada nas concentrações pré-estabelecidas preparadas previamente ao seu fornecimento diário. O álcool etílico absoluto apresenta energia média metabolizável de 5,6 kcal/ml ou 7,1 kcal/g.

Para os grupos Controle A e B, forneceu-se Sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) P.A. (Vetec Química Fina Ltda. – Rio de Janeiro, RJ, Brasil) diluída em água filtrada, homogeneizada antes da sua administração. Esta apresenta energia média metabolizável de 4,2 kcal/g.

Procedimentos experimentais

As ratas dos grupos Teste A e B foram submetidas a período de adaptação, no qual a concentração de etanol foi aumentada até que alcançasse as concentrações experimentais. Solução com 5% de etanol foi administrada para o grupo Teste A por sete dias, o grupo Teste B recebeu 5% e 10% de etanol por sete dias cada.

Posteriormente, as ratas passaram por oito semanas com a dieta nas concentrações experimentais. Um dia após o consumo de etanol, as ratas dos grupos de controle isocalórico foram alimentadas com igual quantidade de ração e volume de dieta líquida consumida pelo grupo álcool associado, com o etanol substituído pela mesma quantidade de calorias de sacarose.

As ratas foram anestesiadas com uma mistura de 13 mg/kg de cloridrato xilasina 2% (Rompum – Bayer – São Paulo, SP, Brasil) com 33 mg/kg de cetamina base (Francotar – Virbac – Roseira, SP, Brasil) por via intramuscular. Transcorrido o período de adaptação, seguido de 4 semanas experimentais. Para a indução da doença periodontal, ligaduras com fio de algodão (Coats – Corrente – São Paulo, SP, Brasil) foram posicionadas ao redor da região cervical

dos primeiros molares inferiores de 6 ratas por grupo, deixando as outras sem ligadura, para servir como controle (Figura 1).



FIGURA 1 – A indução da doença periodontal em ratos por meio da colocação de ligadura de algodão ao redor da coroa dentária do primeiro molar mandibular.

As ratas foram sacrificadas e suas mandíbulas cuidadosamente removidas e fixadas em formalina neutra a 10% por 48 horas, após oito semanas experimentais. O processo alveolar com os três molares foi radiografado.

Análise radiográfica

Cada amostra foi orientada para que as cúspides bucais e linguais do primeiro e segundo molar ficassem sobrepostas e então foram fixadas no sensor radiográfico com cera utilidade. Radiografias digitais foram obtidas utilizando o sistema de imagem por computador RVG® (Radio Visio-Graphy – Trophy radiology Inc. – Marietta, USA). O sensor eletrônico foi exposto a 65 Kv e 7 mA por 0.08 s e a distância fonte/sensor foi de 30 cm (Figura 2).



FIGURA 2 – Cada amostra foi orientada para que as cúspides bucais e linguais do primeiro e segundo molar ficassem sobrepostas e então foram fixadas no sensor radiográfico com cera utilidade.

Dois critérios foram estabelecidos para resultar em adequado alinhamento da imagem. Os dentes não deveriam apresentar sobreposição interproximal e as pontas das cúspides bucais do primeiro e do segundo molares deveriam corresponder às pontas das cúspides linguais dos mesmos dentes.

O suporte ósseo periodontal (SOP) foi medido nas imagens radiográficas com o programa computadorizado de análise de imagem Image Tool v.3.0 (UTHSCSA – San Antonio, TX, USA). Todas as medidas foram realizadas no aspecto distal do primeiro molar mandibular pelo mesmo examinador treinado, calibrado e desconhecedor do grupo ao qual o rato pertencia. Três pontos foram estabelecidos como referência: o ápice da raiz distal (A), a ponta da cúspide distal (C) e o ponto mais profundo do defeito ósseo distal do dente (B). Posteriormente, as distâncias ponta de cúspide-ápice (AC) e ápice-profundidade do defeito ósseo (AB) foram medidas linearmente em milímetros (mm). O suporte ósseo periodontal foi determinado pela fórmula: SOP = AB/AC x 10023 (Figura 3).

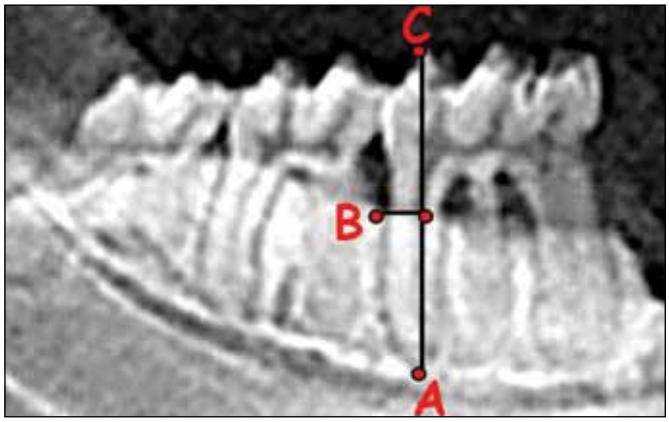


FIGURA 3 – O suporte ósseo periodontal (SOP) na raiz distal do dente com ligadura (direita) e com ligadura (esquerda). AB indicam a distância do ápice (A) ao defeito ósseo periodontal (intercessão das duas linhas), medidas em mm. AC indica a distância do ápice (A) à ponta da cúspide (C) medidas em mm. O percentual de SOP (%) foi calculado de acordo com a fórmula: SOP = AB/AC x 100.

As medidas foram realizadas três vezes em cada dente e os dados médios foram considerados para o SOP. Valor maior de SOP indica menor destruição óssea periodontal. O percentual de suporte ósseo obtido determina a quantidade de osso alveolar remanescente.

Reprodutibilidade

Antes da análise estatística ter sido realizada, o examinador foi treinado por medidas duplas (40%), com duas semanas de intervalo. A estatística do teste t pareado foi realizada e não foi observada diferença entre os valores médios (p=0,1936). Adicionalmente, o coeficiente de correlação de Pearson foi obtido entre as duas medidas e revelou correlação bastante alta (0,9996, p=0,000).

Análise estatística

Durante o período experimental, a dieta consumida foi avaliada como média e desvio padrão por grupo e os resultados expressos descritivamente.

Para a análise radiográfica, os dados foram expressos como valores médios e desvio padrão do percentual (%) do remanescente ósseo periodontal. O teste t pareado foi utilizado para comparações intragrupo entre os dentes com e sem ligadura. A análise de variância (ANOVA seguido do teste de Tukey) foram utilizados para determinar a diferença significante no suporte ósseo periodontal entre os grupos, tanto na presença quanto na ausência de ligadura. Diferenças significantes foram consideradas com nível de 5% ($p < 0,005$).

RESULTADOS

Em relação à quantidade total de calorias ingeridas pelos grupos, foi observado que as ratas do grupo controle normal consumiram 44,97 calorias diárias (kcal/d), todas provenientes da ração. Os animais do grupo Teste A consumiram em média 45,32 kcal/d, sendo 11,04 kcal/d, ou seja, 24,40%, provenientes do etanol. Já as ratas do grupo Teste 2 consumiram em média 51,72 kcal/d, sendo 20,59 kcal/d oriundas do etanol, o que correspondeu a 40,10% das calorias totais da dieta.

A análise radiográfica demonstrou que as ligaduras de algodão colocadas ao redor dos dentes induziram periodontite, determinando percentuais menores de suporte ósseo periodontal em dentes com ligadura do que em dentes sem ligadura ($p<0,05$). Nos dentes sem ligadura, a análise intergrupo não demonstrou diferenças significantes entre os valores de SOP ($p>0,05$; $p=0,2257$). Contudo, quando a periodontite foi induzida, a análise revelou remanescente de suporte ósseo inferior no grupo que recebeu altas doses de etanol (Teste B: 45,38%) em relação a altas doses isocalóricas (Controle B: 51,38%), baixas doses de etanol (Teste A: 50,81%), baixas doses isocalóricas (Controle A: 51,64%) e ao grupo controle normal (52,44%) (Figura 4).

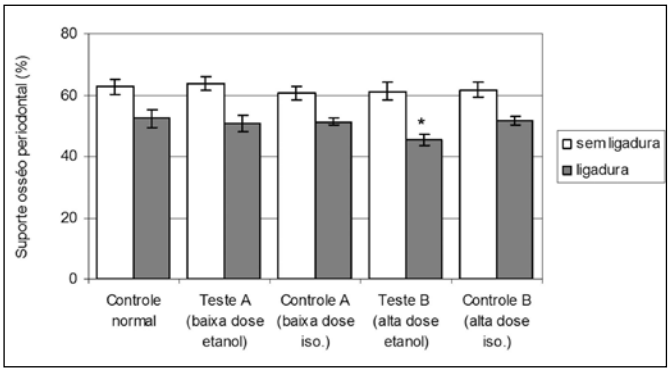


FIGURA 4 – Média e desvio padrão do SOP (%) em dentes com e sem ligadura.

DISCUSSÃO

O efeito do álcool sobre a doença periodontal existe e esta relação tem sido explicada por meio de diferentes mecanismos. Os pacientes alcoolistas crônicos demonstram risco aumentado para o desenvolvimento de uma infecção severa, o que pode ocorrer devido à resposta imunológica alterada (18, 19). O álcool tem efeito tóxico sobre o fígado, causando um efeito negativo sobre o mecanismo de coagulação, e indivíduos alcoolistas severos frequentemente apresentam desordens nutricionais resultado da deficiência de proteínas e vitaminas (20). Adicionalmente, o etanol altera o metabolismo ósseo demonstrando efeitos dramáticos nos ossos em ratos (21). Como consequência dos efeitos tóxicos sobre o fígado, osso e sistema imunológico e nutrição, o álcool pode interferir no mecanismo da resposta inflamatória na doença periodontal.

O consumo abusivo de álcool, além de causar desordens orgânicas, representa um fator contribuinte de morte por causas externas, especialmente aquelas causadas por acidentes de trânsito e homicídios (22).

O presente estudo encontrou relação entre o consumo de altas doses de álcool e a redução do suporte ósseo periodontal com da indução experimental de periodontite em ratas fêmeas. Diferentemente, em ratos machos foi observada redução do SOP com periodontite induzida, associadas a ingestão de baixas e altas doses de etanol (17).

Esta alteração periodontal associada a maior dosagem alcoólica pode estar relacionada à questão hormonal do gênero dos animais. O estrógeno apresenta importante função na manutenção da massa óssea em mulheres adultas, em parte por tornar o processo de remodelamento ósseo mais lento e também por manter o equilíbrio da balança entre a atividade das células formadoras ósseas e as células ligadas à reabsorção óssea (23). Estudo histométrico da densidade óssea alveolar em ratos machos e fêmeas consumindo altas doses de etanol demonstrou maior densidade óssea no gênero feminino, independente do consumo crônico de álcool, o qual não interferiu no padrão ósseo (24). A questão hormonal dos animais pode ter interferido para a ocorrência mais tardia de agravamento da periodontite em ratas observada no presente estudo.

A estrutura do tecido periodontal em ratos é muito similar a dos humanos (25). O método radiográfico de mensuração do suporte ósseo periodontal pode ser utilizado para a detecção de defeitos interproximais intraósseos (26) e foi utilizado neste estudo.

A indução da doença periodontal em animais pode ser obtida por meio de vários métodos, entre os quais se verifica a colocação de ligadura de algodão ao redor da coroa dentária do primeiro molar mandibular (15, 17). Kuhr et al. (2004) verificaram que a perda óssea ligadura-induzida foi particularmente visível no décimo quinto dia e subsequentemente houve estagnação na progressão da perda óssea até o sexagésimo, indicando a diminuição do efeito da ligadura (27).

O período experimental do consumo de álcool foi baseado em estudo prévio, que demonstrou que os efeitos negativos do etanol sobre o metabolismo ósseo em 8 semanas, associado com uma dieta líquida modificada contendo 8,1% de etanol, correspondendo a 35% de calorias derivadas do etanol (21). Este mesmo período experimental foi empregado nos estudos que avaliaram o efeito do consumo de álcool no tecido ósseo alveolar de ratos com a indução de periodontite (16, 17, 28, 29).

O etanol é uma droga psicoativa e possui valor energético substancial (7,1 kcal/g). No alcoolista, o álcool representa em média 50% da ingestão total de energia diária. Como consequência, o álcool substitui muitos nutrientes da dieta normal, resultando em má nutrição primária. Além disso, a má nutrição secundária pode resultar de má digestão ou má absorção causada por complicações gastrointestinais associadas com o alcoolismo (20).

Em estudos que avaliem o efeito do álcool sobre o tecido ósseo, é de grande importância a incorporação de um grupo controle nutricional isocalórico, que receberá a mesma proporção de calorias consumidas pelo grupo álcool, porém, fornecidas por outro energético, como a maltose ou sacarose. Assim, pode-se estabelecer se as alterações observadas são decorrentes do efeito do álcool sobre os tecidos ou da deficiência nutricional associada à administração da dieta alcoólica (21).

CONCLUSÃO

Concluindo, o presente estudo demonstrou que ingestão de altas doses de álcool agrava a progressão da perda óssea periodontal resultante de periodontite experimental. Estes resultados indicam que a ingestão de álcool pode ser um indicador de risco para a periodontite, mas estudos posteriores são necessários para confirmar essa interação.

Declaração de conflito de interesse: Os autores declaram que não há nenhum conflito de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol 2000. 1997;14:216-48.
2. Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. Periodontol 2000. 2001;25:8-20.
3. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. Periodontol 2000. 2003;32:11-23.
4. Stanford TW, Rees TD. Acquired immune suppression and other risk factors/indicators for periodontal disease progression. Periodontol 2000. 2003;32:118-35.
5. Hornecker E, Muuss T, Ehrenreich H, Mausberg RF. A pilot study on the oral conditions of severely alcohol addicted persons. J Contemp Dent Pract. 2003;4:51-9.
6. Novacek G et al. Dental and periodontal disease in patients with cirrhosis: role of etiology of liver disease. J Hepatol. 1995;22:576-82.
7. Khocht A, Janal M, Schleifer S, Keller S. The influence of gingival margin recession on loss of clinical attachment in alcohol-dependent patients without medical disorders. J Periodontol. 2003;74:485-93.
8. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. J Periodontol. 2001;72:183-9.
9. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. Alcohol consumption and periodontal disease. The third national health and nutrition examination survey. J Clin Periodontol. 2004;31:484-8.
10. Jansson L. Association between alcohol consumption and dental health. J Clin Periodontol. 2008;35:379-84.
11. Kongstad J, Hvidtfeldt UA, Gronbaek M, Jontell M, Stoltze K, Holmstrup P. Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen City Heart Study. J Clin Periodontol. 2008;35:1032-9.
12. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. J Clin Periodontol. 1999;26(6):335-40.
13. Anbinder AL, Prado FA, Prado MA, Balducci I, Rocha RF. The influence of ovariectomy, simvastatin and sodium alendronate on alveolar bone in rats. Braz Oral Res. 2007;21(3):247-52.
14. Bosco AF, Bonfante S, Almeida JM, Luize DS, Nagata MJH, Garcia VG. A Histologic and Histometric assessment of the influence of nicotine on alveolar bone loss in rats. J Periodontol. 2007;78(3):527-32.
15. Holzhausen M, Garcia DF, Pepato MT, Marcantonio E Jr. The influence of short-term diabetes mellitus and insulin therapy on alveolar bone loss in rats. J Periodontal Res. 2004;39(3):188-93.
16. Irie K, Tomofuji T, Tamaki N, Sanbe T, Eruni D, Azuma T, Maruyama T, Yamamoto T. Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. J Dent Res. 2008;87(5):456-460.
17. 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.
18. Messingham KAN, Faunce DE, Kovacs EJ. Alcohol, injury, and cellular immunity. Alcohol. 2002;28:137-49.
19. Pavia CS, Mothe M, Kavanagh M. Influence of alcohol on antimicrobial immunity. Biomed Pharmacother. 2004;58:84-9.
20. Lieber CS. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. Alcohol Res Health. 2003;27:220-31.
21. Hogan HA, Argueta F, Moe L, Nguyen LP, Sampson HW. Adulton-set alcohol consumption induces osteopenia in female rats. Alcohol Clin Exp Res. 2001;25:746-54.
22. Gomes LCD, Stein AT, Bigolin AV, Lenzi LGS, Vitor RS. Prevalência de alcoolemia em óbitos por acidente de transporte e por outras causas externas. Rev AMRIGS. 2010;54(3):273-7.
23. Turner RT, Sibonga JD. Effects of alcohol use and estrogen on bone. Alcohol Res Health. 2001;25(4):276-81.
24. Prado MA, Prado FA, Souza DM, Alonso JMSL, Rocha RF, Carvalho YR. Avaliação histomorfométrica do consume de álcool sobre o tecido ósseo mandibular de ratos por gênero. Braz Oral Res. 2006;(Supl.1):116.
25. Page RC, Schroeder HE. Periodontitis in man and other animals: a comparative review. New York: Korger; 1982. p. 71-106.
26. Klausen B, Evans RT, Sfintescu C. Two complementary methods of assessing periodontal bone level. Scand J Dent Res. 1989;97:494-9.
27. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. J Periodontal Res. 2004;39:101-6.
28. Souza DM, Rocha RF. Low caloric value of ethanol itself increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in male rats. Braz Oral Res. 2009;23(4):460-6.
29. Souza DM, Ricardo LH, Kantorski KZ, Rocha RF. Influence of alcohol consumption on the alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. Braz Oral Res. 2009;23(3):326-32.

✉ Endereço para correspondência
Daniela Martins de Souza
Departamento de Biociência e Diagnóstico Bucal
Av. Engenheiro Francisco José Longo, 777
12245-000 – São José dos Campos, SP – Brasil
☎ (12) 3947-9034
danimart.voy@terra.com.br

Recebido: 13/6/2011 – Aprovado: 10/7/2011