

Efeito da ingestão crônica de álcool na progressão de periodontite induzida em ratos da linhagem Fischer-344

Effect of chronic alcohol ingestion on the progression of periodontitis induced in Fisher-344 rats

Alex SEMENOFF SEGUNDO¹

Tereza Aparecida Delle Vedove SEMENOFF²

Éder Ricardo BIASOLI²

RESUMO

Objetivo: Compreender o efeito do uso crônico de álcool na progressão de periodontite induzida em ratos da linhagem Fischer-344.

Métodos: Para o estudo utilizaram-se 22 ratos da linhagem Fischer-344, com dois meses de idade, divididos nos grupos: álcool (n=8), ligadura (n=7) e controle (n=7). No primeiro dia, expuseram-se os animais do grupo álcool à ingestão de solução de água com álcool a 20% (volume/volume), até o dia 90. Decorridos trinta dias do início do experimento, os animais do grupo álcool e do grupo ligadura submeteram-se à colocação de fio de seda em volta do segundo molar superior direito. Nada foi realizado no lado esquerdo, servindo como controle. Todos os grupos submeteram-se à eutanásia, após 60 dias da colocação da ligadura. Para avaliar a destruição da periodontite, usou-se o exame radiográfico, mensurando a destruição da altura óssea.

Resultados: Os resultados do estudo evidenciaram que, no lado em que foi induzida a periodontite, o grupo que ingeriu álcool sofreu um aumento de destruição, demonstrando diferenças estatísticas ($p < 0,05$), se comparado ao grupo ligadura e ao controle. E, maior destruição óssea no grupo ligadura quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Conclusão: Conclui-se, dentro das limitações do estudo, que o consumo crônico de álcool por ratos da linhagem Fischer-344 induziu a uma maior progressão de periodontite induzida.

Termos de indexação: alcoolismo; periodontite; ratos endogâmicos F344.

ABSTRACT

Objective: Understand the effect of chronic alcohol on the progression of periodontitis induced in Fischer-344 rats.

Methods: For the study, 22 Fischer-344 rats, two months old were used, divided into groups: alcohol (n=8), ligature (n=7) and control (n=7). On the first day, the animals in the alcohol group were exposed to ingestion of a water solution containing 20% alcohol (size/size), up to day 90. After thirty days from the beginning of the experiment, the animals in the alcohol group and the ligature group were submitted to the placement of a silk thread around the right maxillary second molar. Nothing was performed on the left side, serving as control. All the groups were submitted to euthanasia 60 days after ligature placement. To assess the destruction of periodontitis, a radiographic exam was used to measure the destruction of bone height.

Results: The results of the study showed that on the side in which periodontitis was induced, the group that ingested alcohol suffered an increase in destruction, with statistical differences when compared with the ligature and control groups and increased bone destruction in the ligature group when compared to control.

Conclusion: Within the limitations of the study, it was concluded that chronic alcohol consumption by Fischer-344 rats led to greater progression of induced periodontitis.

Indexing terms: alcoholism; periodontitis; rats inbred F344.

INTRODUÇÃO

O alcoolismo é, nos dias atuais, um sério problema de saúde pública. No Brasil estima-se uma prevalência de 1 a 13% da população como sendo alcoólatras¹⁻⁴. Ensaios epidemiológicos vêm ligando a doença periodontal ao con-

sumo de bebidas. Em vários estudos transversais analisados sobre o tema, percebe-se uma ligação entre o abuso do álcool e uma piora nos indicadores de saúde periodontal⁵⁻⁷.

Estudos que viabilizem o conhecimento da patogênese entre a periodontite e o alcoolismo são importantes ferramentas, auxiliando na compreensão acerca deste problema. Por circunstâncias éticas, estudos em seres

¹ Universidade de Cuiabá, Faculdade de Odontologia, Cuiabá, MT, Brasil.

² Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Odontologia, R. Professora Azélia Mamoré de Melo, 318, Edifício Renoir, apt. 63, Araés, 78005-700, Cuiabá, MT, Brasil. Correspondência para / Correspondence to: TADV SEMENOFF (t.semenoff@uol.com.br).

humanos, buscando a compreensão dos eventos biológicos, tornam-se difíceis e muitas vezes impossíveis de se realizar. Neste momento opta-se por trabalhos em ratos como modelo experimental, pois os mesmos, além de custos baixos prestam-se bem a este padrão de pesquisa⁸⁻⁹.

Nos dias atuais sabe-se da intercomunicação entre o sistema nervoso central, endócrino e o imunológico¹⁰⁻¹¹. As evidências mostram que uma maior ativação do eixo HPA (hipotálamo-pituitário-adrenal) favorece a progressão de doenças infecciosas, entretanto, determina uma menor suscetibilidade a doenças auto-ímmunes¹².

A linhagem dos ratos Fischer-344 é conhecida por ter uma hiper-reatividade do eixo HPA, levando a uma maior produção de cortisona e a uma menor resposta imunoinflamatória, tendo, como consequência, maior progressão de doença periodontal¹³⁻¹⁴. Compreender o efeito do álcool em ratos com forte ativação do eixo HPA parece ser um achado interessante.

Diante deste contexto, o objetivo foi compreender o efeito do uso crônico de álcool na progressão de periodontite induzida em ratos da linhagem Fischer-344.

MÉTODOS

Para o presente experimento foram selecionados 22 ratos, com dois meses de idade, da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Fischer-344. Os mesmos passaram por uma adaptação ao novo ambiente durante uma semana. Os animais foram mantidos em caixas moradias, alojados em número de três ou quatro por caixa, com ração padronizada e água *ad libitum*, sob ciclo claro/escuro, temperatura controlada a 23° C e umidade \pm 55%. O experimento foi aprovado e registrado pelo comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, sob o n° 16/06.

Doença periodontal experimental

Todos os procedimentos de indução de doença periodontal foram realizados sob anestesia geral, através de administração intramuscular de 0,1 ml de cloridrato de quetamina (Dopalen, Agribands. Saúde Animal, Paulínia, SP, Brasil), associado a 0,05 ml de cloridrato de xylazina (Rompun, Bayer. Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil) por cada 100 gramas de peso corporal. Selecionaram-se para anestesia os grupos álcool e ligadura, acondicionando-se um fio de sutura estéril número 4 (Ethicon, Johnson e Johnson, São Paulo, Brasil) em volta do

segundo molar superior direito. Após a colocação das ligaduras, aguardou-se um período de 60 dias, sendo todos os grupos submetidos à eutanásia por excesso anestésico.

Delineamento do estudo

Os animais foram divididos no primeiro dia de forma aleatória (pessoa de fora do estudo) em: grupo álcool (n=8), grupo ligadura (n=7) e grupo controle (n=7). Após a divisão, os animais do grupo álcool começaram a ingerir água destilada e solução etanólica - 20% (volume/volume) – prática que perdurou por noventa dias. Decorridos os primeiros trinta dias de ingestão da bebida, acondicionou-se fio de seda, com o intuito de acumular microorganismos nos grupos álcool e ligadura, e aguardou-se sessenta dias para submetê-los à eutanásia, deles e dos animais do grupo controle (Figura 1).

Exame radiográfico

As peças removidas, contendo hemimaxila direita, foram fixadas em formol a 10%, por 48 horas. Em seguida, colocaram-se os espécimes sobre a película radiográfica, de forma que ficasse estabilizada com cera utilidade. Posicionaram-se as maxilas com os dentes paralelos ao cone do aparelho de Raios X, buscando um ângulo de 90° em relação à fonte emissora dos raios (Spectro 70x, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, São Paulo).

As radiografias (*Kodak insight dental film*), depois de reveladas e fixadas, foram montadas em molduras e inseridas em um projetor de slides (Kodak-Ektagraphic III, São Paulo), de forma a amplificar em 12 vezes o tamanho original da radiografia. Para análise radiográfica, o examinador cego identificou as imagens projetadas em quadro-negro, desenhando as estruturas do espaço interproximal entre primeiro e segundo molares.

Após este passo, traçaram-se duas linhas horizontais paralelas entre si. A primeira linha foi traçada no plano oclusal, na altura das cúspides. A segunda linha, na porção mais coronal da crista óssea. Traçadas as linhas, realizaram-se as mensurações entre a crista óssea e o plano oclusal com régua acrílica (Acrimed, Indústria Brasileira de Produtos Acrílicos e Metalúrgicos Ltda.) de 30 cm, apoiada diretamente na imagem projetada em uma tela adequada.

Análise dos resultados

Depois de realizadas as análises radiográficas das hemimaxilas, os resultados foram agrupados nos grupos: álcool (maxila direita), ligadura (maxila direita) e controle (maxila direita). Converteram-se as médias das distâncias radiográficas em milímetros e compararam-se as medidas das maxilas, respectivamente, entre os três grupos.

Para confiabilidade da leitura dos dados, estipulou-se a calibragem intraexaminador. Realizou-se esse procedimento durante as mensurações do estudo em um terço da amostra. As duas leituras não apresentaram diferenças estatísticas ($p>0,05$) com uma diferença do erro padrão de 0,03mm.

Para a realização dessas comparações, usaram-se os testes ANOVA (análise de variância) com corretivo de *Bonferroni* e o teste *T* para amostras pareadas na fase de calibragem. Todos os testes tiveram um nível de significância de 5%.

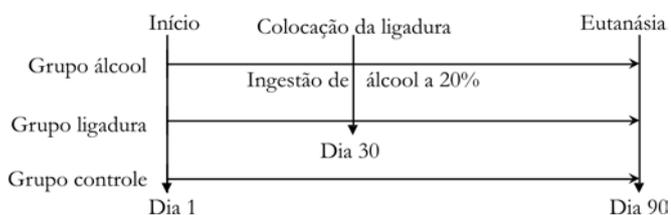


Figura 1. Delineamento do trabalho.

Tabela 1. Representa as médias e desvios-padrões (+) em mm, dos grupos álcool, ligadura e controle, para a distância entre a crista óssea e o plano oclusal. Letras diferentes em linha vertical representam diferença estatística significativa ($p<0,05$).

	Média	Desvio-Padrão
Álcool	2,34	0,32 A
Ligadura	2	0,18 B
Controle	1,05	0,17 C

RESULTADOS

Os resultados deste estudo demonstram os parâmetros relacionados às diferentes médias e desvios padrões (\pm), em milímetros, das distâncias entre o plano oclusal e a crista óssea mais coronal entre o primeiro e segundo molares superiores.

Foi possível observar que o grupo álcool (ingestão de álcool + ligadura) apresentou maior destruição óssea, com diferença estatística, quando comparado aos grupos ligadura e controle. O grupo ligadura, por sua vez, apresentou maior destruição da crista óssea, com diferença estatística comparada com o grupo controle.

DISCUSSÃO

Os resultados do estudo confirmam o efeito deletério do álcool na progressão da periodontite induzida, confirmando achados dos estudos epidemiológicos⁵⁻⁷. Possivelmente o álcool diminuiu a defesa imunoinflamatória, influenciando uma maior progressão do processo infectoinflamatório no periodonto.

Estes resultados corroboram com demais achados da literatura, que demonstram serem os bebedores patológicos mais susceptíveis às doenças bem conhecidas como o câncer, cirrose hepática, pancreatite, tuberculose, entre outras¹⁵⁻¹⁷.

Ratos da linhagem Fischer demonstram ser mais susceptíveis à periodontite induzida, comparados às outras espécies¹⁸. Parece que o efeito do alcoolismo crônico provavelmente alterou o funcionamento do eixo HPA, induzindo o sistema neuroimunológico a ter um predomínio ainda maior de células *T helper* do tipo 2. Essas células, além de retroalimentar o cérebro, produzem maior quantidade de metaloproteinases e interleucinas, compatíveis com maior destruição no periodonto^{12-14,18}.

Outro fator, que pode ter colaborado para uma maior progressão da periodontite induzida, é a ação do álcool nas fibras colágenas, unidades fundamentais do periodonto. A ação do álcool em fibras colágenas foi um dos objetivos de um estudo que induziu o consumo de álcool, e observou-se uma interferência de maior destruição de fibras colágenas do tipo IV, quando comparada ao grupo controle¹⁹.

Sabe-se que o uso crônico de álcool tem uma ação deletéria no hipocampo²⁰. Em estudo com ratos, Breivik et al.²¹ induziram a lesões nessa estrutura do cérebro, e perceberam uma maior progressão de periodontite em animais com esse tipo de lesão. Possivelmente um dos fatores que colaboraram para uma maior progressão da periodontite, neste estudo, esteja ligado a lesão do hipocampo e seus mediadores.

De forma geral, os animais mais propensos ao consumo do álcool têm uma menor ativação do eixo HPA, diferente da espécie Fischer-344. Estudando o efeito do álcool em um mediador que altera a ativação do eixo HPA, Khisty et al.⁹ observaram que o consumo de álcool por um período curto foi suficiente para alterar a fisiologia no sistema nervoso central (SNC). Com o prolongamento do uso do álcool, os animais estudados tiveram uma tendência a tolerar o estímulo, adaptando-se. Observa-se neste trabalho que, apesar de serem usados ratos de linhagem Fischer, o que sugere uma resistência ao álcool, provavelmente o uso mais prolongado interferiu na tentativa de adaptação, tendo por consequência uma maior progressão da periodontite induzida.

Existem diferentes formas para mensurar a destruição ocorrida no periodonto²²⁻²⁴. Optou-se pelo método radiográfico por ser de custos baixos, rápido e de boa confiabilidade nos resultados⁸; entretanto, a perda de informações qualitativas dos processos ocorridos na região da periodontite é uma limitação.

Observaram-se nesse trabalho importantes princípios de pesquisa. Dentre eles, o cegamento e a escolha aleatória dos ratos para os grupos. Esses procedimentos foram realizados por um pesquisador que desconhecia diagnósticos na área da odontologia. A calibragem foi realizada durante a leitura do trabalho, obtendo-se ausência de significância estatística e com diferença do erro padrão pequeno, confirmando a confiabilidade do método. Um fator que diminui a força do estudo é o tamanho da amostra; contudo, comparado com trabalhos nesta área do conhecimento, a eles se equipara^{3, 25-27}.

Existem diversas formas de indução de uso abusivo do álcool no rato. Optou-se por esse método por ser simples e estabelecido na literatura^{9, 17, 19, 20, 28}.

REFERÊNCIAS

- Almeida LM, Coutinho ESF. Prevalência de consumo de bebidas alcoólicas e de alcoolismo em uma região metropolitana do Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1993; 27(1): 23-9.
- Cardim MS, Assis SG, Sberze M, Iguchi T, Morgado AF. Epidemiologia descritiva do alcoolismo em grupos populacionais do Brasil. *Cad Saúde Pública*. 1986; 2(2): 191-211.
- Primo NLMP, Stein AT. Prevalence of alcohol abuse and dependence in Rio Grande, state of Rio Grande do Sul: a cross-sectional, population-based survey. *Rev Psiquiatr Rio Gd Sul*. 2004; 26(3): 280-6.
- Rego RA, Berardo FAN, Rodrigues SSR, Oliveira ZMA, Oliveira MB, Vasconcellos C, et al. Risk factors for non-communicable chronic diseases: a domiciliary enquiry in the City of S. Paulo, Brazil. Methodology and preliminary results. *Rev Saúde Pública*. 1990; 24(4): 277-85.
- Shimazaki, Y, Saito T, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, et al. Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama Study. *J Periodontol*. 2005; 76(9): 1534-41.
- Shizuishi S, Hayashi N, Tamagawa H, Hanioka T, Maruyama S, Takeshita T, et al. Lifestyle and periodontal health status of Japanese works. *Ann Periodontol*. 1998; 3(1): 303-11.
- Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease *J Periodontol*. 2001; 72(2): 183-9.
- Breivik T, Gundersen Y, Osmundsen H, Fonnum F, Opstad PK. Neonatal dexamethasone and chronic tianeptine treatment inhibits ligature-induced periodontitis in adults rats. *J Periodontal Res*. 2006; 41(1): 23-32.
- Khisti RT, Boyd KN, Kumar S, Leslie Morrow AL. Systemic ethanol administration elevates deoxycorticosterone levels and chronic ethanol exposure attenuates this response. *Brain Res*. 2005; 1049(1): 104-11.
- Anisman H, Baines MG, Berczi, I, Bernstein CN, Blennerhassett MG, Gorczynski RM, et al. Neuroimmune mechanisms in health and disease: 2. Disease. *CMAJ*. 1996; 155(8): 1075-82.
- Blalock JE. The syntax of immune – neuroendocrine communication. *Immunol Today*. 1994; 15(11): 504-11.
- Chrousos GP. the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med*. 1995; 332(20): 1351-62.
- Breivik T, Thrane PS, Gjermo P, Opstad PK, Pabst R, Hörsten SV. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by experimental periodontal disease in rats. *J Periodontal Res*. 2001; 36(5): 295-300.
- Breivik T, Thrane PS, Murison R, Germeo P. Emotional stress effects on immunity, gingivitis and periodontitis. *Eur J Oral Sci*. 1996; 104(4): 327-34.
- Dantas RO. Effect of time of alcoholism on the development of organic diseases in women treated at the University Hospital of Ribeirão Preto, S. Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 1985; 19(4): 304-10.
- Jozala E, Infante S, Marchini JS, Okano N. Alcohol, tobacco and middle third squamous esophageal cancer: a case-control study. *Rev Saúde Pública*. 1983; 17(3): 221-5.
- Murphy JM, Steward RB, Bell RL, Badia-Elder NE. Phenotypic and genotypic characterization of the Indiana University rat lines selectively bred for high and low alcohol preference. *Behav Genet*. 2002; 32(5): 363-88.

CONCLUSÃO

Conclui-se, dentro das limitações do estudo, que o uso crônico de álcool em ratos da linhagem Fischer-344 induziu a uma maior progressão de periodontite induzida.

Colaboradores

AS SEGUNDO participou de toda a parte experimental do referido artigo, desde a seleção dos animais até a mensuração das radiografias e elaboração da discussão. TADV SEMENOFF participou como auxiliar na colocação das ligaduras e no processamento das radiografias, levantamento bibliográfico e escrita do trabalho. ER BIASOLI participou da análise estatística dos resultados e elaboração da discussão.

18. Breivik T, Thrane PS. Psychoneuroimmune interactions in periodontal disease. In: Alder R, Felten DL, Cohen N (eds). *Psychoneuroimmunology*. 3rd edn. San Diego: Academic Press; 2001. p. 627-44.
19. Yesilli Ç, Mungan G, Serçkiner I, Akduman B, Numanoglu G, Mungan A. Effects of ethanol on intracorporeal structures of the rat. *Int Urol Nephrol*. 2006; 38(1): 129-32.
20. Fadda F, Rossett ZL. Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*. 1998; 56(4): 385-431.
21. Breivik T, Thrane PS, Gjerme P, Cools A, Myhrer T. Effects of hippocampal lesioning on experimental periodontitis in Wistar rats. *J Periodontal Res*. 2002; 37(5): 360-5.
22. Benatti BB, Nogueira-Filho GR, Diniz MC, Sallum EA, Sallum AW, Nociti FH Jr. Stress may enhance nicotine effects on periodontal tissues. An in vivo study in rats. *J Periodontal Res*. 2003; 38(3): 351-3.
23. Cavagni J, Soletti AC, Gaio JE, Rösing KC. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Braz Oral Res*. 2005; 19(4): 290-4.
24. Crawford JM, Taubman MA, Smith DJ. The natural history of periodontal bone loss in germfree and gnotobiotic rats infected with periodontopathic microorganisms. *J Periodontal Res*. 1978; 13(4): 316-25.
25. Sallay K, Sanavi F, Ring I, Pham P, Berhling UH, Nowotny A. Alveolar bone destruction in the immunosuppressed rat. *J Periodontal Res*. 1982; 17(3): 263-74.
26. Shapira L, Hourri-Haddad Y, Frolov I, Halabi A, Ben-Nathan D. The effect of stress on the inflammatory response to *Porphyromonas Gingivalis* in mouse subcutaneous chamber model. *J Periodontol*. 1999; 70(3): 289-93.
27. Susin C, Rösing CC. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar Rats. *Acta Odontol Scand*. 2003; 61(5): 273-7.
28. Tampier L, Quintanilla ME. Saccharin consumption and the effect of a long-term exposure to a sweetened alcoholic solution in high - (UChB) and low - (UChA) alcohol - drinking rats. *Alcohol*. 2005; 37(1): 47-52.

Recebido em: 13/8/2008
Aprovado em: 26/11/2008