



MESTRADO EM ODONTOLOGIA

GIOVANNA LIMA DORE GAAG

**EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DO ETANOL NA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR
E NA DENSIDADE ÓSSEA: ESTUDO EM RATOS.**

Guarulhos

2013



MESTRADO EM ODONTOLOGIA

GIOVANNA LIMA DORE GAAG

EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DO ETANOL NA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E NA DENSIDADE ÓSSEA: ESTUDO EM RATOS.

Dissertação apresentada à Universidade Guarulhos para
obtenção do título de mestre em Odontologia

Área de Concentração: Periodontia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marta Ferreira Bastos

Co- Orientadora: Prof^a Dr^a Poliana Mendes Duarte

Guarulhos

2013

Gaag, Giovanna Lima Dore

Efeito do consumo crônico do etanol na perda óssea alveolar e na densidade óssea: estudo em ratos/ Giovanna Lima Dore Gaag. Guarulhos, 2013.

54 f.; 31 cm

Dissertação (Mestrado em Odontologia, Periodontia)
Centro de pós-graduação, Pesquisa e Extensão, Universidade
Guarulhos, 2013.

Orientador: Prof^a. Dra. Marta Ferreira Bastos
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Poliana Mendes Duarte
Bibliografia: f. 48-54

1. Etanol; 2. Perda óssea alveolar; 3. Ligadura; 4. TRAP; 5. RANKL; 6.
OPG. I. Título. II. Universidade Guarulhos.

CDD-617



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, intitulada “EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO DO ETANOL NA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR E NA DENSIDADE ÓSSEA: ESTUDO EM RATOS” em sessão pública realizada em 23 de Janeiro de 2013, considerou a candidata GIOVANNA LIMA DORE GAAG aprovada.

COMISSÃO EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Marta Ferreira Bastos (UnG) Marta Ferreira Bastos

2. Profa. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro (UNIP) _____

3. Prof. Dr. Luciene Cristina de Figueiredo (UnG) Luciene de Figueiredo

Guarulhos, 23 de Janeiro de 2013.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda a comunidade científica e aos colegas cirurgiões-dentistas. Que todos aproveitem os conhecimentos achados neste estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter iluminado o meu caminho em todas estas idas e vindas durante estes dois anos de curso.

Agradeço profundamente aos queridos meus pais, Herbert Clement Dore e Soraya Vilar de Lima e avó, Nilze Vilar de Lima, com o infinito amor, apoio e incentivo. Com certeza vocês fizeram a diferença na minha formação.

Meu obrigado ao meu amado esposo Pedro Paulo Alves Gaag, que sempre me orientou e me deu muita força em todos os desafios que passei nesta batalha.

Agradeço de coração a minha orientadora professora Marta e a minha co-orientadora professora Poliana, que com toda a paciência souberam transmitir seus conhecimentos para o meu aprendizado.

Agradeço as amizades que fiz em Guarulhos, incluindo também todos os meus professores com quem convivi e que sem dúvida hoje desfrutam junto a mim esta conquista.

RESUMO

O álcool é uma substância que vem sendo amplamente consumida em todo mundo. A ingestão crônica desta substância tem sido associada a efeitos deletérios ao tecido ósseo, como por exemplo: diminuição da massa e da densidade óssea, aumento do risco de fraturas, alteração do processo de formação de novo osso e apoptose de células osteoprogenitoras. Embora alguns estudos tenham associado o alcoolismo com a ocorrência e aumento da gravidade da doença periodontal, resultados controversos podem ser encontrados na literatura. O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do consumo crônico de etanol sobre a perda óssea alveolar (POA) induzida por ligadura e a densidade óssea alveolar (DOA) em ratos jovens. Trinta ratos Wistar foram distribuídos em um dos grupos: Controle: sem ingestão de etanol ($n=15$); Etanol: ingestão de concentrações crescentes de cachaça durante 100 dias ($n=15$). No 70º dia após o início da ingestão de etanol, o primeiro molar inferior recebeu a ligadura, enquanto o dente contralateral foi deixado sem ligadura. Após 30 dias os ratos foram sacrificados. Foram analisadas na região de furca dos molares inferiores com e sem ligadura, a perda óssea alveolar, a densidade óssea alveolar, as célula positivas para: fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP), o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta (RANKL) e osteoprotegerina (OPG). Teste t pareado foi utilizado para comparações dentro do mesmo grupo de POA entre dentes com e sem ligadura e, para peso corpóreo inicial e final. Teste t não pareado foi empregado para avaliar as diferenças significativas entre os grupos controle e etanol em relação ao peso, POA, DOA, e número de células positivas para TRAP, RANKL, OPG e proporção RANKL/OPG. O nível de significância de todas as análises foi estabelecido em 5% ($p<0.05$). O grupo Etanol apresentou maior perda óssea e número de células positivas para RANKL e OPG, menor densidade óssea e número de células positivas para TRAP no osso alveolar ao redor dos dentes com ligadura quando comparado ao grupo controle ($p<0.05$). O grupo Etanol também apresentou uma maior perda óssea ao redor de dentes sem ligadura quando comparado ao grupo controle. O consumo de etanol na presença e ausência de ligadura afetou negativamente o osso alveolar por aumentar a perda óssea alveolar e reduzir a densidade óssea.

Palavras-chave: Etanol, perda óssea alveolar, ligadura, TRAP, RANKL, OPG.

ABSTRACT

Alcohol has been widely consumed in worldwide. The chronic ingestion of this substance has been associated with deleterious effects on bone tissue, such as: a decreased of mass and bone density, increase the risk of fractures, changing the formation of new bone process and osteoprogenitor cell apoptosis. Although some studies have associated the chronic alcoholism with the occurrence and increased severity of the periodontal disease, controversial results can be found in the literature. The aim of the present study was to assess the impact of chronic consumption of ethanol on alveolar bone loss (BL), induced by ligature, and on alveolar bone density (BD) in peripubertal rats. Rats were assigned into one of the groups: Control: non-ingestion of ethanol (n=15); Ethanol: ingestion of ascending concentrations of *cachaça* during 100 days (n=15). On the 70th day after the beginning of ethanol ingestion, one first mandibular molar received a ligature, while the contralateral tooth was left unligated. After 30 days, the rats were killed. BL, BD, the positive cells for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), receptor activator of nuclear factor Kappa beta ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) were analyzed in the furcation area of the ligated and unligated mandibular molars. Paired *t* test was used for intragroup comparisons of BL between ligated and unligated teeth and between initial and final body weights. Unpaired *t* test was employed to evaluate the significant differences between control and Ethanol groups regarding body weights, BL, BD and number of TRAP+ cells, RANKL+ cells, OPG+ cells and ratio of RANKL/OPG+ cells. The significance level established for all analyses was 5% ($p < 0.05$). The Ethanol group presented greater BL and number of RANKL and OPG+ cells and lower BD and number of TRAP+ cells around ligated teeth ($p < 0.05$), when compared to the control group. The Ethanol group also presented a higher BL around unligated teeth when compared to the control group. The ethanol consumption, both *per se* and in the presence of ligature, negatively affected alveolar bone by increasing the alveolar BL and reducing BD.

Key Words: Ethanol, alveolar bone loss, ligature, TRAP, RANKL e OPG.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1 Tecido Ósseo	10
1.2 Alcoolismo	14
1.3 Doença Periodontal	19
1.4 Consumo Crônico de Álcool e Doença Periodontal	20
1.5 Justificativa	24
2. PROPOSIÇÃO	25
3. ARTIGO CIENTÍFICO	26
4. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tecido Ósseo

Trata-se de um tecido conjuntivo altamente especializado e dinâmico composto por células específicas, matriz extracelular (orgânica e inorgânica), espaços que incluem a medula óssea, canais vasculares, canalículos e trabéculas. A matriz orgânica ou não-mineralizada apresenta 95% de sua constituição por colágeno tipo I, além de outros tipos de colágenos, proteínas não-colagenosas e proteoglicanos. A matriz inorgânica ou mineralizada contém predominantemente íons de cálcio e fosfato que se arranjam para formar os cristais de hidroxiapatita, depositados dentro da matriz colagenosa (Miroslavjevic et al., 2003).

Dentre suas inúmeras funções pode-se citar a proteção de órgãos, apoio de estruturas corporais, ligação com os músculos permitindo a locomoção, resistência às cargas, forma cavidade adequada para a hematopoiese na medula óssea e participação como reservatório de minerais.

Das células ósseas, os osteoblastos são derivados do mesênquima e responsáveis pela formação, deposição e manutenção deste tecido. Sintetizam os componentes de matriz orgânica extracelular e controlam a mineralização desta matriz. São responsáveis pela produção de colágeno tipo I e outros tipos de colágeno, fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina e receptores do hormônio da paratireóide. Diferenciam-se em células ósseas de revestimento e osteócitos. As células ósseas de revestimento são células alongadas que recobrem a superfície do tecido ósseo e são responsáveis pelo início da remodelação óssea por degradação da matriz (Everts et al., 1992). Os osteoblastos se transformam em osteócitos depois de terem sido circundados pela matriz óssea. Os osteócitos maduros alteram sua morfologia, formando processos dendríticos que lhes permitem comunicar com outros osteócitos incorporados (Nobel et al., 2003). Osteócitos são células com poucas organelas, no entanto atuam como sensores de carga mecânica e transmitem essa informação às outras células dentro do osso, e assim participam da homeostasia do cálcio sanguíneo, regulando a massa e estrutura óssea (Hughes et al., 2006).

Para que ocorra a formação óssea, as células progenitoras mesenquimais indiferenciadas migram para o local, proliferam e então se diferenciam em osteoblastos. Estas células osteoprogenitoras estão presentes na medula óssea, endósteo e no periôsteo. A diferenciação e o desenvolvimento dos osteoblastos pelas células osteoprogenitoras são dependentes da liberação dos fatores de crescimento osteoindutores, como por exemplo, as proteínas morfogenéticas (BMPs), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), fatores de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento de fibroblasto (FGF) (Khaled et al., 2011).

A atividade de formação óssea está constantemente associada à reabsorção óssea, que é iniciada e mantida pelos osteoclastos. Estas são as únicas células capazes de quebrar osso mineralizado, cartilagem calcificada e dentina (Udagawa et al., 1990). Morfológicamente os osteoclastos são células precursoras hemopoéticas, gigantes, multinucleadas, com muitas mitocôndrias e lisossomos. A fusão através de projeções da membrana dos osteoclastos é considerada essencial para reorganização do citoesqueleto e para selar o sítio de reabsorção (Miyamoto, 2011). O componente mineral da matriz é dissolvido por ácidos dentro dos sítios de reabsorção e a matriz orgânica é degradada por enzimas específicas. Os componentes da matriz óssea são degradados e endocitados, processados pelo osteoblasto e liberados para o exterior através da membrana do lado oposto ao que está ocorrendo à reabsorção (Manolagas, 2000).

Ao longo da vida, o osso está em constante remodelamento, por osteoclastos que desmineralizam e reabsorcem o osso antigo e por osteoblastos que depositam osso novo para manter uma massa óssea adequada. Qualquer desequilíbrio neste processo de remodelação óssea pode alterar a densidade óssea mineral, comprimento e a micro arquitetura do tecido ósseo. A causa mais comum desse desequilíbrio é o aumento da atividade osteoclástica (Wright et al., 2009).

Mudanças hormonais e produção de citocinas inflamatórias podem alterar o equilíbrio da função dos osteoclastos e osteoblastos, levando a uma perda de massa óssea (osteoporose) ou a um aumento de massa óssea (osteopetrose) (Del Fattore et al., 2008; Rauner et al., 2007).

Recentes avanços neste campo de pesquisa levaram à descoberta dos mecanismos moleculares e as proteínas envolvidas no processo de reabsorção óssea. Atualmente, comprehende-se que este processo é controlado por um sistema

composto principalmente por três proteínas: o receptor ativador do fator nuclear kappa-beta (RANK), o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-beta (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG), que é o “competidor natural” por RANKL (Leibbrandt et al., 2008). A descoberta do sistema RANKL, RANK, OPG tem sido um dos mais importantes avanços em biologia óssea nos últimos anos. Este sistema de sinalização é essencial para a homeostase esquelética e a sua ruptura leva a mudanças no padrão de reabsorção óssea *in vitro* e *in vivo* (Holm et al., 2009).

OPG é uma glicoproteína solúvel secretada por diversas células mesenquimais, tais como osteoblastos e células da medula óssea e expressa em uma grande variedade de tecidos, incluindo pulmão, fígado, rim, coração, estômago, intestino, cérebro, medula espinhal, glândula tireóide, tecido muscular liso e osso, indicando possíveis funções múltiplas (Yun et al., 1998). Atua como um inibidor da maturação e ativação dos osteoclastos, devido à sua alta afinidade de ligação com o RANKL, prevenindo a interação de RANKL com o RANK, consequentemente a ligação de OPG ao RANKL inibe a reabsorção óssea (Boyce e Xing, 2008). Diferentes mediadores aumentam a produção de OPG, tais como: Interleucina-1 (IL-1), TNF- α e TNF- β (Miroslavjevic et al, 2003) e outros diminuem a sua síntese, como paratormônio (PTH) e prostaglandina E2 (PGE2) (Hofbauer e Schoppet, 2004). O fato do OPG naturalmente antagonizar os efeitos do RANKL e assim preservar a integridade óssea, torna importante a avaliação da proporção entre RANKL e OPG para regulação da atividade osteoclástica (Del Fattore et al., 2006).

RANKL é um membro da família do fator de necrose tumoral (TNF) e pode ser encontrado na superfície de inúmeros tipos celulares, tais como: linfócitos T, linfócitos B, osteoblastos, precursores de osteoblastos, megacariócitos. Além disto, pode também ser encontrado em sua forma solúvel (sRANKL) (Wong et al., 1997). Kartsogiannis et al. (1999), detectaram a expressão do mRNA e da proteína RANKL em uma variedade de tecidos, incluindo osso, cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, intestino, músculo esquelético, tecido mamário, placenta, baço, timo e testículo. A principal função do RANKL é regular a osteoclastogênese, estimulando sinais de diferenciação e ativação de precursores osteoclásticos, gerando assim a reabsorção óssea e contribuindo com o processo de remodelação óssea. Um aumento na produção de RANKL por células osteoblásticas leva a diferenciação, ativação e aumento do tempo de sobrevivência de osteoclastos e consequente aumento da reabsorção óssea (Gallagher, 2011). A expressão de RANKL pode ser estimulada

pela ação de PTH, 1,25 (OH)₂ vitamina D₃, glicocorticoides, prostaglandina E2, IL-6, IL-8 e IL-11 (Khosla, 2001).

O terceiro participante do sistema de remodelação óssea é o RANK, que foi descoberto por Anderson et al. (1997), por sequenciamento de cDNA a partir de células dendríticas mielóides derivadas da medula óssea humana. RANK é uma glicoproteína transmembrana composta por 616 aminoácidos e membro da família de receptores do TNF- α , que pode ser expressa em células precursoras de osteoclastos (monócitos circulantes), osteoclastos maduros, células dendríticas (Miyamoto, 2011), na superfície de células mamárias epiteliais glandulares (Fata et al., 2000), células de câncer de mama (Kim et al., 2006) e células de câncer de próstata (Chen et al., 2006).

A interação de RANKL com RANK presente na superfície de células precursoras de osteoclastos é o principal mecanismo molecular de reabsorção óssea (Mackiewicz et al., 2011). Esta ligação ativa o fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa\beta$), que é um fator de transcrição pleiotrópico que promove a expressão de vários genes responsáveis pela diferenciação de pré-osteoclastos em osteoclastos e também na ativação de osteoclastos maduros (Soysa e Alles, 2009). Desta maneira, o NF- $\kappa\beta$ regula a formação, função e sobrevivência de osteoclastos e a síntese de vários mediadores, dentre estes, a fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) (Wada et al., 2006).

O TRAP é uma fosfatase ácida que apresenta localização intracelular (lisossomal) em osteoclastos, macrófagos e células dendríticas, embora alguns estudos demonstrem que esta enzima possa ser secretada (Habermann et al., 2007). Possui importante participação no desenvolvimento do esqueleto, devido ao efeito negativo que apresenta sobre a atividade de osteoblastos, sendo essencial para a reabsorção exercida pelos osteoclastos. O TRAP tem sido utilizado como marcador histoquímico da atividade osteoclástica, por estar envolvido na síntese e processamento de colágeno tipo I e também devido seu efeito sobre a mineralização do tecido ósseo por degradar osteopontina (Habermann et al., 2007; Roberts et al., 2007; Haymam, 2008).

1.2 Alcoolismo

O alcoolismo é o consumo vicioso e imoderado do álcool (Mulligan et al., 2011). Caracterizado pelo controle deficiente de ingestão, episódios frequentes de intoxicação e obsessão pelo consumo, apesar das suas consequências adversas. Dentre os 26 fatores de risco avaliados pela Organização Pan-americana da Saúde (OPS), o álcool foi o quinto fator de risco em relação à morte prematura e incapacidade em todo o mundo (OPS, 1994).

O uso prejudicial de álcool resulta na morte de 2,5 milhões de pessoas anualmente. Existem 60 tipos diferentes de doenças em que o álcool tem um papel causal significativo. Em 2005, o consumo mundial total foi 6,13 litros de álcool puro por pessoa acima de 15 anos (*Global Information System on Alcohol and Health*-OMS, 2012).

Segundo a OPS (2007), o Brasil apresenta 57,40% de indivíduos que fazem uso de quantidades elevadas de bebida alcoólica, sendo 65,52% do sexo masculino e 46,32% do sexo feminino. Na Argentina observa-se um alto consumo, de 30,07%, sendo o sexo masculino responsável por 55,52% e o feminino por 36,7%. O Peru relata uma prevalência geral de 37,2%, o sexo masculino com 59,06% e o feminino com 26,11%. A população uruguaia exibe 18,40% do alto consumo, o sexo masculino autores de 36,70% e o feminino de 7,37%. A Costa Rica descreve uma prevalência de 26,93% para o sexo masculino, 33,98% e o feminino, 11,29%. Os mexicanos assumem porcentagem geral de 28,54%, o sexo masculino de 56,60% e o feminino de 9,04%. A Nicarágua relata uma baixa porcentagem geral de 16,8%, já no sexo masculino, 40,23% e no sexo feminino, 6,64%. O Canadá expõe uma porcentagem de 48,26%, com uma prevalência no sexo masculino, 63,45% em comparação ao feminino com 36,7%.

A porcentagem de consumo do álcool nos EUA foi de 51,8% acima de 12 anos, isso se traduz em cerca de 133,4 milhões de consumidores de álcool. Na faixa etária de 21 a 25 anos observou-se o maior consumo do álcool, com 69,7%. Quanto ao sexo, indivíduos do sexo masculino apresentaram maior consumo (56,8%) e o sexo feminino com 47,1%, em idade acima dos 12 anos (SAMHSA, U.S. Department of Health and Human Services, 2011).

A utilização generalizada de bebidas alcoólicas está associada a possíveis consequências sociais e de saúde, desde a redução da produtividade de trabalho até o comportamento violento, assim como às diversas formas de doenças hepáticas, cardíacas, do sistema nervoso central e periférico (Borges et al., 2004; Do et al., 2011; Mulligan et al., 2011). O álcool também tem sido relacionado a comportamentos de risco, incluindo sexo inseguro e transmissão do vírus HIV, uso do cigarro e outras substâncias psicoativas (Delorenze et al., 2011). Cerca de 67% dos alcoólatras, também são fumantes. Os alcoólatras tendem a iniciar o consumo de tabaco mais cedo, fumam durante mais tempo, consomem maior número de cigarros por mês e apresentam fluxo expiratório mais baixo do que os abstêmios (Chahieb, 1998).

O álcool tem vários alvos, uma vez que afeta diversos processos celulares e moleculares. O desarranjo da resposta inflamatória desencadeado pelo consumo de álcool leva a alteração da produção de citocinas e quimiocinas por vários tipos de células, influenciando respostas de outros tipos celulares. Os transtornos da resposta inflamatória associado ao álcool afeta negativamente o processo de cicatrização de feridas. O efeito da exposição aguda do álcool sobre o processo de cicatrização persiste por muitos dias durante a cicatrização, a recuperação de fratura óssea, bem como após queimaduras (Jung et al, 2011).

Por meio de uma revisão sistemática da literatura Rehm et al. (2012), identificaram doenças relacionadas ao uso do álcool em humanos. Em associação ao consumo médio de álcool foram evidenciadas as seguintes doenças: tuberculose, câncer (boca, faringe, nasofaringe, orofaringe, cólon, reto, fígado e mama), diabetes mellitus, transtornos depressivos unipolares, epilepsia, doença cardíaca hipertensiva, doença isquêmica do coração, acidente vascular cerebral isquêmico e hemorrágico, distúrbios de condução e outras arritmias, infecções respiratórias, cirrose do fígado, complicações no parto, síndrome alcoólica fetal.

A influência do consumo leve de álcool e tabagismo na densidade óssea foi investigada por Venkat et al. (2009) em jovens soldados do sexo masculino, fisicamente ativos. Foi observado que em homens fisicamente ativos, com condições bem definidas de estilo de vida, o consumo do álcool foi associado à uma maior densidade do fêmur.

O estudo de Tucker et al. (2009), também avaliou a relação da ingestão de bebidas alcoólicas e DMO. Um total de 1.182 homens e 1.289 mulheres no período

de pós-menopausa e 248 em idade fértil participaram deste estudo. Os autores demonstraram que o consumo baixas quantidades de álcool pode ser benéfico para o osso, em ambos os sexos. No entanto, nos homens, o alto consumo foi significativamente associado com menor DMO. A cerveja e o vinho apresentaram forte correlação com os níveis de DMO quando comparada ao licor, o que sugere que outros componentes presentes nas bebidas alcoólicas, além do etanol, podem interferir no efeito do etanol sobre o tecido ósseo.

Resultados similares foram encontrados por Sommer et al. (2012), no qual foi explorado o estilo de vida, a associação da ingestão de álcool com a densidade da matriz óssea em mulheres idosas. Foi observado que a densidade da matriz óssea estava significativamente maior nas mulheres que consumiam álcool mais que 3 vezes na semana em comparação às abstêmias, o que sugere que o consumo de álcool leve pode exercer efeitos protetores sobre a saúde óssea em mulheres idosas.

O consumo do álcool também pode causar uma pancreatite crônica, que consequentemente pode levar à perda da massa da óssea corpórea. Esta relação foi pesquisada por Schnitzler et al. (2010), em 13 pacientes do sexo masculino negros com 41 anos. O consumo foi considerado crônico excessivo quando maior que 170 g/dia por um período entre 7 a 26 anos. Foram avaliados parâmetros histomorfométricos da crista ilíaca cortical e trabecular, bioquímica relevante ao tecido ósseo, função hepática e sobrecarga de ferro. Houve uma redução da espessura cortical e trabecular e também do volume trabecular. Além disto, foi observada uma diminuição da taxa de formação óssea, de aposição mineral, assim como um aumento da superfície corroída, diminuição dos níveis de magnésio e insuficiência de vitamina D.

Estudos em animais são muito válidos para avaliar as associações já conhecidas e até outras possíveis relações do álcool com organismo. Dai et al. (2000), investigaram a indução do alcoolismo crônico na osteoclastogênese e perda de massa óssea por meio da Interleucina (IL)-6 em ratos. Os animais foram alimentados com dietas controle ou etanol, durante quatro meses. Constatou-se que ingestão de etanol no grupo teste, diminuiu a densidade mineral óssea, o volume de osso trabecular, a largura trabecular e o perímetro dos osteoblastos. Além disso, o etanol aumentou o espaçamento trabecular, a superfície dos osteoclastos, as unidades formadoras de granulócitos-macrófagos e a osteoclastogênese. Os autores

ainda sugeriram que o etanol induz à perda óssea por meio do aumento dos níveis da IL-6 via indução de RANKL.

A cicatrização óssea alveolar pode ser modificada por fatores locais e sistêmicos. Bombonato-Prado et al. (2004), avaliaram o possível efeito de administração de bebida alcoólica durante a formação óssea em torno de implantes de hidroxiapatita/fosfato tricálcio no interior de alvéolos dentários pós-extração em ratos machos. Este estudo mostrou um atraso no processo de cicatrização alveolar causada pela ingestão prolongada do álcool. Isto foi visto principalmente através da diminuição da formação de osso novo.

O consumo crônico de álcool também reduz a massa e a força óssea, aumentando o risco de fraturas e também apresenta possível efeito na reabsorção óssea. Callaci et al. (2004), examinaram os efeitos do uso compulsivo e repetido de álcool na reabsorção óssea, DMO e resistência à compressão vertebral em ratos machos adultos tratados com risedronato. O modelo de consumo de álcool foi realizado por meio de injeções intraperitoneais de 20% de álcool v/v por 3 semanas. Não foram observados efeitos após a primeira e segunda semana de tratamento, porém após 3 semanas, os resultados do grupo álcool foram: redução significativa da DMO da coluna lombar e distal do fêmur, diminuição da resistência à compressão vertebral, menor volume de osso trabecular e um aumento da separação trabecular. O grupo que fez uso do risedronato manteve o nível de DMO e as propriedades biomecânicas vertebrais.

O efeito do consumo de álcool sobre o sistema músculo-esquelético em longo prazo em ratos foi pesquisado por Maddalozzo et al. (2009). O álcool foi incluído na dieta (35%) durante três meses. Os ratos alimentados com álcool apresentaram menor peso, massa magra, massa gorda e percentual de gordura corporal, quando comparados aos grupos controle. Além disso, tiveram menor contratura lenta e rápida, menor conteúdo ósseo mineral, menor DMO e menor volume de osso esponjoso na vértebra lombar e na região proximal da tíbia. O álcool diminuiu a formação de osso, de leptina e IGF-I e aumentou a adiposidade da medula óssea.

Mercer et al. (2012) avaliaram o efeito da suplementação com vitamina D sobre a perda óssea associada à administração crônica do álcool em ratas. A exposição crônica do álcool foi associada a uma diminuição significativa da densidade óssea trabecular e cortical, resultando na perda de resistência óssea. A suplementação dietética pode evitar a toxicidade esquelética causada pelo álcool,

por normalizar a homeostasia de cálcio, mediante a prevenção de apoptose e reabsorção óssea.

Estudos *in vitro* encontrados na literatura também relatam o efeito do álcool sobre as células do tecido ósseo. A habilidade de diferenciação das células-tronco mesenquimais de indivíduos que consumiam álcool foi avaliada por Suh et al. (2005). As células foram isoladas da medula óssea durante substituições de quadril em pacientes com osteonecrose induzida pelo uso crônico excessivo de álcool na região de epífise do fêmur. O grupo controle foi composto por indivíduos com fraturas de colo de fêmur. As células obtidas a partir de pacientes com osteonecrose induzida pelo álcool apresentaram capacidade reduzida para diferenciação nas linhagens osteogênicas, quando comparadas com as células dos pacientes com fraturas de colo de fêmur. A alteração da função das células mesenquimais pode ser responsável pela patogênese da osteonecrose.

O efeito do álcool sobre a diferenciação de células-tronco clonadas da medula óssea de rato foi investigado por Cui et al. (2006). As células foram divididas em dois grupos (teste e controle), apenas o grupo teste foi tratado com concentrações crescentes de etanol. As células do grupo teste apresentaram acúmulo de vesículas de triglicerídeos a partir do sétimo dia e foi observado o aumento significativo do número de adipócitos e da percentagem da área que continha estas células. O nível de atividade da fosfatase alcalina e de expressão de osteocalcina foi diminuída. Os resultados indicam que o abuso do álcool pode ser um dos mecanismos que levam à osteoporose e osteonecrose.

1.3 Doença Periodontal

A doença periodontal é um processo infeccioso que afeta o tecido periodontal e está relacionado à presença de microrganismos e seus subprodutos (Loesche et al., 1985).

Em uma fase inicial, o tecido gengival responde ao acúmulo de biofilme com um processo inflamatório agudo, que é caracterizada pela intensificação do fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular a neutrófilos e monócitos-macrófagos, que partem do sangue periférico para o sulco gengival. Subsequentemente, as células T e B surgem no local da infecção, produzindo citocinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α) e imunoglobulinas como uma resposta antigênico-específica. A alteração funcional dos fibroblastos resulta na perda de colágeno perivasicular. A degradação de tecidos está limitada a células epiteliais e fibras de colagénio do tecido conjuntivo. Em seguida, na fase da lesão estabelecida, ainda não há perda óssea e predominam os plasmócitos, podendo permanecer estável por anos ou décadas, ou ainda pode progredir para uma lesão destrutiva (Page et al., 1976).

Há um consenso na literatura que os agentes primários das doenças periodontais são os microrganismos específicos presentes no biofilme dental. Das mais de 600 espécies bacterianas identificadas no biofilme subgengival, apenas um pequeno número parece ter envolvimento na patogênese das doenças periodontais. Associações entre 40 espécies bacterianas presentes na microbiota subgengival de indivíduos saudáveis e com doença periodontal, foram analisadas por Socransky et al. em 1998. No ambiente subgengival foram descritos cinco complexos bacterianos e proposto uma possível sequência de colonização dessas espécies. Os três primeiros complexos são compostos por espécies relacionadas à saúde periodontal e demonstraram grande associação entre si. Dentre eles o complexo roxo (*Actinomyces odontolyticus* e *Veillonella parvula*), o complexo amarelo (*Streptoccus mitis*, *Streptoccus sanguinis*, *Streptoccus oralis*, *Streptoccus intermedius*, *Streptoccus gordoni*) e o complexo verde (*Capnocytophaga sputigena*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens*) (Socransky e Haffajee, 2002). Os complexos laranja e vermelho são formados por espécies consideradas patogênicas. O laranja composto por (*Fusobacterium*

nucleatum, *Fusobacterium periodonticum*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Parvimonas micra*, *Eubacterium nodatum*, *Campylobacter rectus*, *C. showae*, *Campylobacter gracilis* e *Streptococcus constellatus*). O complexo vermelho foi fortemente relacionado com profundidade de sondagem e sangramento à sondagem e é composto pelas espécies (*Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Treponema denticola*). Posteriormente, algumas espécies de actinomicetos (*Actinomyces gerencseriae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naesludii* sorotipos 1 e 2) foram agrupadas em um novo complexo, denominado Actinos (Socransky e Haffajee, 2002). O microorganismo *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sorotipo a e b não pertencem a nenhum complexo e tem sido associado à doença periodontal agressiva (Zambon, 1996).

Além do biofilme bacteriano outros fatores podem desempenhar um importante papel na exacerbação da periodontite. Por tal motivo, tem-se pesquisado vastamente possíveis fatores de risco. A intensidade da associação, plausibilidade biológica, efeitos dose-resposta, consistência temporal e de descobertas, são alguns quesitos que um fator de risco necessita para obter reconhecimento. Nos dias atuais o fumo e a Diabetes Mellitus não controlada preenchem esses quesitos (Grossi et al., 1995). Outros possíveis indicadores tem sido alvo de investigações, tais como: alcoolismo (Irie et al., 2008), estresse (Peruzzo et al., 2008), osteoporose (Kobayashi, 2012), obesidade (Kraus et al., 2012), consumo de cafeína (Bezerra et al., 2008), hipertensão (Bonato et al., 2012), doenças cardiovasculares (Dhadse et al., 2010).

1.4 Consumo Crônico de Álcool e Doença Periodontal

Inúmeros fatores influenciam a progressão da periodontite, incluindo: características individuais, fatores sociais e comportamentais, fatores sistêmicos, fatores genéticos, fatores bucais e a composição do biofilme dental (Genco, 1996; Numm, 2003).

A associação do consumo crônico do álcool e a doença periodontal vêm sendo investigada por diversos estudos. E percebe-se uma ligação entre o abuso do álcool e uma piora nos indicadores de saúde periodontal (De Souza et al., 2006; Irie et al., 2008; Souza, 2009; Dantas et al., 2012). Estudos a respeito da patogênese

existente entre o alcoolismo e a periodontite são importantes instrumentos para entendimento deste assunto.

Tezal et al. (2001) avaliaram a ligação entre o consumo de álcool e a gravidade da doença periodontal em 1.371 indivíduos com idades entre 25 a 74 anos. O consumo de álcool foi avaliado por meio de questionários autoaplicáveis. As variáveis de desfecho foram sangramento gengival , perda de inserção clínica, perda óssea alveolar e presença de microrganismos subgengivais. Os resultados mostraram um aumento significativo do risco de sangramento gengival ($p <0,001$), perda de inserção ($p <0,001$), perda de osso alveolar ($p <0,05$) proporcionalmente ao nível de ingestão de álcool. Os grupos com consumo elevado tinham níveis significativamente maiores de cálculo, sangramento gengival e perda de inserção clínica em comparação aos grupos com baixo consumo. O consumo de álcool não foi significativamente relacionado com a perda de osso alveolar, nem aos microrganismos subgengivais pesquisados. Os autores concluem que o álcool está associado moderadamente ao agravamento da doença periodontal. Em 2004, Tezal et al. avaliaram o efeito do alto consumo de álcool sobre o agravamento da doença periodontal em 13.198 trabalhadores com idade a partir de 20 anos. Após o controle das variáveis de confundimento, observou-se que o risco de perda de inserção clínica aumenta proporcionalmente com o maior consumo de álcool ($p= 0,0001$), caracterizando uma relação dose-dependente.

A associação entre consumo de álcool e periodontite também foi pesquisada por Pitiphat et al. (2003). O estudo prospectivo selecionou 39.461 homens com idade de 40 a 75 anos, livres de periodontite no início do acompanhamento. O consumo de álcool foi avaliado no início e atualizado a cada quatro anos por um questionário. O estado da doença periodontal foi auto-relatado e validado com radiografias. A análise multivariada foi ajustada para idade, tabagismo, diabetes, índice de massa corporal, atividade física, período de tempo e ingestão calórica. Foi constatado 2.125 casos de periodontite. Os resultados mostram uma associação positiva entre a ingestão de álcool e a periodontite. Os homens que bebiam álcool tinham um risco 18-27% maior desta doença do que os abstêmios. Os autores concluem que o consumo de álcool é um fator de risco independente e modificável para periodontite.

Bouchard et al. (2006), em um estudo transversal identificaram as variáveis relacionadas com a perda de inserção clínica em uma população adulta francesa.

Foram selecionados 2.132 indivíduos com idades entre 35 e 64 anos, cada um com pelo menos seis dentes em boca. Os participantes foram submetidos à avaliação clínica periodontal, de dentes perdidos e também a testes laboratoriais e questionários. Os resultados indicaram que o hábito de consumir bebidas alcoólicas influiu na perda de inserção clínica.

A dependência do álcool e a doença periodontal foi investigada por Amaral et al. (2008), em um estudo transversal com 49 homens usuários de álcool e 49 não-usuários. Foram coletados dados sociodemográficos, comportamentais e periodontais, tais como índice de placa visível (IPV), sangramento à sondagem (BOP), profundidade de sondagem (PD) e nível clínico de inserção (CAL). Após a análise de regressão linear múltipla constatou-se que o grupo de usuários de álcool tiveram maior média de idade ($p = 0,006$), mas não foram encontradas diferenças significativas de renda, educação e condições de vida entre os grupos. A média da PD, do CAL e da porcentagem dos sítios com PD ou CAL $\geq 4\text{mm}$, foram estatisticamente maiores para o grupo de usuários de álcool. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos para os percentuais médios de sítios com IPV e BOP.

Em uma revisão sistemática da literatura, Amaral et al. (2009) pesquisaram a relação da dependência do consumo de álcool com a periodontite. Uma busca por estudos foi realizada de Janeiro de 1965 a Julho de 2008. Dos 1.530 artigos identificados, 11 transversais e 5 longitudinais observacionais preencheram os critérios de inclusão. Sete dos 12 estudos sobre o consumo de álcool e todos os 4 estudos sobre a dependência de álcool, relataram associação positiva entre consumo de álcool e periodontite. Houve heterogeneidade entre os estudos sobre os métodos de avaliação de dependência de álcool, consumo de álcool e periodontite. Os autores sugeriram que o consumo de álcool pode ser considerado um indicador de risco para periodontite. Estudos longitudinais sobre a associação de dependência de álcool e consumo de álcool com a periodontite são necessários para confirmar ou não essa associação.

Os hábitos de higiene bucal, a capacidade de acesso ao dentista e o tipo de serviço recebido em um grupo de indivíduos alcoólicos e não-alcoólicos, foi analisada por Khocht et al. (2009). Eles concluíram que a saúde bucal de alcoólicos e tóxico dependentes é muitas vezes negligenciada, sendo eles incapazes de praticar uma higiene dental básica adequadamente, aumentando os níveis de placa.

O que pode ser explicado pelo déficit da atividade motora associado ao uso prolongado e excessivo do álcool.

A composição da microbiota subgengival de indivíduos alcoólatras foi descrita por Amaral et al. (2011). Quarenta e nove homens consumidores de álcool e 49 abstêmios tiveram amostras de biofilme subgengival coletadas a partir de 4 sítios, sendo dois com profundidade de sondagem < 4 milímetros e dois ≥ 4 milímetros. A prevalência das espécies bacterianas entre grupos não mostrou diferença significativa. No entanto, os consumidores de álcool apresentaram contagens médias significativamente mais altas de *A. aggregatibacter*, *F. nucleatum* e *P. gingivalis* ($p < 0,001$). Além disso, níveis médios significativamente mais elevados de *C. sputigena*, *Fusobacterium nucleatum vincentii*, *F. nucleatum*, *Gemella morbillorum*, *Neisseria mucosa*, *P. gingivalis*, *S. gordonii* e *T. forsythia* em locais com profundidade de sondagem < 4 milímetros ou ≥ 4 milímetros em comparação aos não-alcoolistas ($p \leq 0.001$). Os sítios rasos de alcoolistas apresentaram níveis significativamente maiores de *F. nucleatum vincentii*, *F. nucleatum nucleatum*, *P. gingivalis* e *T. forsythia* do que sítios com profundidade de sondagem ≥ 4 milímetros de não-alcoólicos ($p \leq 0.001$). Portanto os indivíduos alcoólatras exibiram maior número de periodontopatógenos na microbiota subgengival aos indivíduos abstêmios.

A associação entre o consumo de álcool e periodontite, foi exposto por Lages et al. (2012). Uma amostra composta por 542 indivíduos de ambos os sexos, 35 a 55 anos de idade, foi submetida a exame periodontal completo e dividida em quatro grupos de acordo com a frequência de uso de álcool. As associações entre a ocorrência de periodontite e variáveis de riscos potenciais foram analisadas. A prevalência da doença periodontal nos grupos, uso ocasional, uso moderado, uso intenso e dependência de álcool foram: 17,2%, 24%, 29,6% e 53%, respectivamente. A ocorrência de periodontite entre usuários de álcool foi alta e a frequência de consumo de álcool aumentou as chances de periodontite de forma incremental principalmente em fumantes.

1.5 Justificativa

Considerando que ainda não há um esclarecimento completo disponível na literatura a partir de um modelo *in vivo* que avalie o efeito do alcoolismo crônico na doença periodontal, o objetivo deste estudo foi avaliar, o efeito do consumo crônico do etanol sobre a densidade, perda óssea alveolar, atividade de fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) e expressão de osteoprotegerina (OPG) e ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta (RANKL) na periodontite induzida por ligadura em ratos.

2. PROPOSIÇÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do consumo crônico do etanol sobre a densidade e a perda óssea alveolar induzida por ligadura. Também foram avaliados a atividade de fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP) e expressão de osteoprotegerina (OPG) e ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa beta (RANKL) na periodontite induzida por ligadura em ratos.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

EFFECTS OF ETHANOL, ON ALVEOLAR BONE LOSS AND BONE DENSITY: A STUDY IN RATS.

ABSTRACT

Background: The aim of the present study was to assess the impact of chronic consumption of ethanol on alveolar bone loss (BL), induced by ligature, and on alveolar bone density (BD) in rats.

Methods: Rats were assigned into one of the groups: *Control*: non-ingestion of *Ethanol* (n=15); *Ethanol*: ingestion of ascending concentrations of ethanol during 100 days (n=15). On the 70th day after the beginning of ethanol ingestion, one first mandibular molar received a ligature, while the contralateral tooth was left unligated. After 30 days, the rats were killed. BL, BD, the positive cells for tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) were analyzed in the furcation area of the ligated and unligated mandibular molars.

Results: The *Ethanol* group presented greater BL and number of RANKL and OPG+ cells and lower BD and number of TRAP+ cells around ligated teeth ($p<0.05$), when compared to the control group. The *Ethanol* group also presented a higher BL around unligated teeth when compared to the control group.

Conclusions: Ethanol consumption, both *per se* and in the presence of ligature, negatively affected alveolar bone by increasing the alveolar BL and reducing BD.

Key Words: alcohol, alveolar bone loss, ligature, TRAP, RANK ligand, osteoprotegerin

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) estimates that approximately 6.13 liters of pure alcohol were consumed per person in 2005. Moreover, 4% of all deaths in world were attributed to heavy alcohol consumption, which was especially fatal for males aged 15 to 59 years (WHO, 2011). In addition, epidemiological data indicates that a high rate of adolescents aged between 12 and 20 years are drinkers and, had drunk alcohol for the first time before the age of 13 years (Boekeloo and Novik, 2011).

In Brazil, 31.8% of the population are considered former drinkers, whereas 11.2% of the population are alcohol dependent. Liver cirrhosis and traffic accidents are the main causes of alcohol-associated deaths in this country (WHO, 2012). *Cachaça* is a typical Brazilian alcoholic beverage produced from fermentation and distillation of fresh sugarcane juice, which possesses an high alcoholic content that usually varies from 38 to 48% v/v at 20°C (Ministry of Agriculture, 2005 and 2009).

Long-term alcohol consumption has been associated with an increased risk of oral diseases such as caries and periodontitis (Khocht et al., 2009). Clinical studies regarding the relationship between periodontitis and alcohol consumption presented contradictory results. While some studies have demonstrated a positive correlation between alcohol and periodontal diseases (Tezal et al., 2000; Tezal et al., 2001; Novacek et al., 1995; Pitiphat et al., 2003; Nishida et al., 2004), others have shown no or a weak association between both conditions (Torrungruang et al., 2005; Shimazaki et al., 2005). Some investigations have suggested that the association between alcohol and periodontal diseases is attributed to the disability of alcoholics to practice an adequate oral hygiene (Larato et al., 1972; Sakki et al., 1995). However, Amaral et al. (2008) demonstrated negative effects of alcohol consumption on important periodontal parameters, such as clinical attachment level and probing depth even in the presence of an adequate plaque control.

In rats, studies have suggested that alcohol consumption may increase the alveolar bone loss (Souza et al., 2006; Souza et al., 2009) and the expression of inflammatory mediators (e.g. inducible nitric oxide synthase) in gingival tissues in a ligature-induced periodontitis model (Irie et al., 2008; Dantas et al., 2012). Nevertheless, Liberman et al. (2010) concluded that the intake of low concentrations of alcohol did not affect the alveolar bone loss in this experimental model. However, animal studies differ regarding the type of alcoholic beverage, dose of ethanol, time and via of alcohol administration and animal age. Therefore, the aim of the present study was to assess the impact of chronic consumption of Ethanol on alveolar

bone loss (BL), induced by ligature, and on alveolar bone density (BD) in rats. It was hypothesized that the chronic consumption of Ethanol would promote the greatest level of alveolar BL and the lowest percentage of alveolar BD.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Thirty male Wistar rats presenting 50 days of age, acquired from the Butantan Institute (São Paulo, São Paulo, Brazil), were used in this study. The rats weighed 182.83 ± 4.49 g at the beginning of the experiments. During the entire experimental period (100 days), each animal was housed in a plastic cage in the Bioscience Laboratory of Guarulhos University in a room with a 12-hour light/dark cycle and temperature of between 22 and 25°C. The animals were maintained with access to food (Labina, Purina®, Paulinia, SP, Brazil) *ad libitum*. The Institutional Committee for Animal Care and Use at São Paulo University (São Paulo, São Paulo, Brazil) approved the study protocol.

Ethanol consumption and experimental groups

After the acclimatization period (5 days), the rats were randomly assigned to one of the following groups: Control (n=15): animals without ethanol ingestion; Ethanol (n=15): animals subjected to ingestion of ethanol. The ethanol group consumed ethanol *ad libitum* (*Cachaça* 51; Müller Compania de Bebidas, Pirassununga, São Paulo, Brazil), while the control group consumed water *ad libitum* during 100 days.

The protocol of ethanol ingestion was adapted from Pereira et al (2003). Briefly, in the 50 initial days, the animals ingested increasing doses of ethanol (10% v/v and 15% v/v for 15 days/concentration; 20% v/v and 25% v/v for 10 days/concentration). Subsequently, the animals ingested 30% v/v of ethanol during the remaining 50 days. The animals consumed 40 ml of ethanol per day during the experiment

Ligature placement

Seventy days after the beginning of the ethanol consumption, the animals were anesthetized by intraperitoneal administration of xylazine (0.3 ml/kg, Virbaxil; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brazil) and ketamine (0.5ml/Kg, Francotar; Virbac do Brasil Industria e Comércio LTDA, Roseira, SP, Brazil) for ligature placement. A cotton thread was placed around the first right mandibular molar, in a cervical position, in order to induce

alveolar bone loss, while the contralateral molar remained without a ligature for use as a control. Thirty days after the ligature placement the animals were killed by CO₂ inhalation. As such, the animals ingested ethanol during 70 days before the ligature placement and during 30 days after ligature permanence.

Histological procedures and histometric analysis

Bone loss (BL) and bone density (BD) measurements were performed in ligated and unligated mandibular first molars. Rats' lower jaws were removed and fixed in formalin buffer for 12 hours. Subsequently, the specimens were decalcified in a solution containing 4.13% ethylene-diamine tetraacetic acid for 60 days, dehydrated in an ascending series of ethanol solutions, cleared in xylene and embedded in paraffin. Serial sections (5 µm) were obtained in a mesio-distal vertical direction of the mandibular molars. After excluding the first and last sections, in which the furcation area was totally evident, nine sections, 30 µm apart, from each mandibular first molar were obtained. Of these nine sections, five sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) solutions for histometric analyses while four sections were used for histochemistry and immunohistochemistry evaluations. For BL, the areas between the inter-radicular bone crest and the furcation roof (mm²) of the mandibular molars were histometrically determined. For the analysis of tooth-supporting alveolar BD, a standardized rectangular area (1 mm²) was delimited in the furcation area of the unligated and ligated teeth. Afterwards, a checkered diagram was overlaid on this area, constituting a drawing with 360 intersections. The number of intersections, under which bone tissue was present, was counted. BD was calculated according to the following formula: BD = number of intersections with bone counted x 100/320. All analyses were performed using image analysis software (Image-Pro®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) by one trained and blinded examiner (GLDG).

TRAP analysis

TRAP staining was performed to identify and quantify bone-resorption associated cells (Cole and Walters, 1987). Two sections of the central portion of the mandibular molars were deparafinized and incubated at 37°C for 30 min in a solution containing 4mg Naphthol AS-BI, 24 mg red violet salt (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), 30mL acetate buffer (pH 5.2) and 0.3 mmol/L tartrate (pH 5) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). The sections were then washed in distilled water and counter-stained with 1% Fast Green (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). As a negative control for TRAP activity, sections were

incubated in substrate-free medium. The numbers of cells with granules of TRAP reaction products presenting ≥ 3 nuclei were counted in the furcation bone of ligated and unligated molars by one trained, calibrated and blinded examiner (GLDG), using image analysis software (Image-Pro®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Data were expressed as number of TRAP+ cells per mm² of bone.

Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) analyses

Two sections of the central portion of the mandibular molars were mounted on glass slides pre-treated with 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and used for RANKL and OPG immunohistochemical analysis. Sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 5 minutes to eliminate endogenous peroxidase. The sections were blocked with PBS-1% bovine serum albumin for 30 minutes at room temperature before incubation with the primary antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; polyclonal antibodies against RANKL [5 μ g/ml] or OPG [5 μ g/ml]) for 3 hours at room temperature. Sections were then incubated with biotinylated secondary antibody for 45 minutes at room temperature. Subsequently, slides were treated with the streptavidin peroxidase conjugate (Goat ImmunoCruz™ Staining System, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 30 minutes at room temperature. The specific reaction for each antibody was visualized using 3,3'-diaminobenzidine and counter-stained with Mayer's hematoxylin, dehydrated through graded ethanol, cleared in xylene, and mounted on slides with the aid of Entelan mounting media(Merck, Darmstadt, Germany). The specificity of staining was established by withdrawal of the primary antibodies. The number of RANKL+ and OPG+ cells was counted in the furcation bone of ligated and unligated molars by one trained, calibrated and blinded examiner (GLDG), using image analysis software(Image-Pro®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Data were expressed as number of RANKL+, OPG+ and ratio of RANKL/OPG+ cells per mm² of bone.

Statistical analysis

The ideal sample size to assure adequate power in this study was calculated considering differences of 0.5 m² between groups for BL in ligated teeth. In addition, a standard deviation of 0.5 mm² was determined based on a previous study. Based on these data, it was determined that 14 rats per group would be necessary to provide an 85% power with an alpha of 0.05. However, considering the possibility of loss of animals during the experimental procedures, 15 rats were included in each group. All analyses were performed using Prism statistical

software (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA). Data were first examined for normality by the Kolmogorov-Smirnov test and, since data demonstrated normality, analyses were performed using parametric methods. BL, BD, TRAP+ cells and the ratios of RANKL/OPG+ cells were computed for each tooth and averaged for the unligated and ligated teeth of the experimental groups. Paired *t* test was used for intragroup comparisons of BL between ligated and unligated teeth and between initial and final body weights. Unpaired *t* test was employed to evaluate the significant differences between control and Ethanol groups regarding body weights, BL, BD and number of TRAP+ cells, RANKL+ cells, OPG+ cells and ratio of RANKL/OPG+ cells. The significance level established for all analyses was 5% ($p < 0.05$).

RESULTS

Body weight

All animals gained weight during the study; however, the mean body weights were similar between groups at the end of the experimental period ($p > 0.05$). The final mean body weights were 308 ± 35 g and 364 ± 43 g for control and ethanol groups, respectively.

Histometric analysis

As expected, the ligated teeth presented greater BL when compared to unligated teeth for both groups ($p < 0.05$), showing that the ligature model was able to induce loss of alveolar bone. Figure 1 A-D presents the means of BL and BD for unligated and ligated teeth of the control and Ethanol groups. The Ethanol group presented a greater BL than the control group around unligated ($p < 0.001$; Figure 1A) and ligated teeth ($p = 0.0310$; Figure 1C). There was no difference between the control and Ethanol groups with regard to BD in unligated ($p = 0.8213$, Figure 1B). On the other hand, a lower BD was observed in the ligated teeth of the Ethanol group when compared to the control group ($p = 0.0084$, Figure 1D). The histological images (Figure 2A-D) show a larger distance between the bone crest and the furcation roof around the unligated (figure 2B) and ligated teeth (Figure 2 D) of the Ethanol group, when compared to the control group (figure 2A and 2D, respectively).

TRAP staining

There was no difference between groups in relation to the number of TRAP+ cells in the alveolar bone of unligated teeth ($p=0.3027$; Figure 3A). However, the bone around the ligated teeth of the Ethanol group demonstrated a lower number of TRAP+ cells, when compared to the control group ($p<0.001$; Figure 3D). The representative histological sections of TRAP staining for control and Ethanol groups for unligated and ligated teeth are shown in Figure 3 B, C, E and F.

Immunohistochemical analysis

There were no differences between groups in relation to the number of RANKL+ cells ($p=0.7034$), OPG+ cells ($p=0.6836$) and the ratio of RANKL/OPG+ cells ($p=0.8901$) in the alveolar bone around unligated teeth (Figure 4A-C). The Ethanol group showed a higher number of RANKL+ ($p=0.023$) and OPG+ ($p=0.0186$) cells in the alveolar bone around the ligated teeth (Figures 4D and 4E). However, there were no significant differences in the ratio of RANKL/OPG+ cells in the alveolar bone of the ligated teeth of the Ethanol group (Figure 4F). Figures 5A-F shows the representative histological sections of immunohistochemical staining for RANKL and OPG around the unligated teeth of the control and Ethanol groups. Figure 6A-D presents the immunohistochemical staining around the ligated teeth of both groups.

DISCUSSION

The actual influence of alcohol consumption on periodontal diseases is still unclear, especially when considering that there is a wide difference among the alcoholic contents of beverages worldwide. This study evaluated the effects of chronic consumption of *Cachaça*, a Brazilian distilled beverage, extensively consumed in the world, on alveolar BL and BD in peripubertal rats. A rat model for alcohol abuse was used to circumvent the limitations of human studies in which the levels of alcohol consumption are difficult to precisely control. In addition, the alcohol consumption model used allows the assessment of additional parameters to those of clinical studies, such as bone microarchitecture and histomorphometry, and the microscopy of bone cells (Lelovas et al., 2008). Overall, results show that ethanol intake may affect adversely alveolar bone in the presence and absence of biofilm accumulation. Therefore, the hypothesis that the chronic consumption of ethanol would promote greater levels of alveolar BL and lower percentages of alveolar BD was accepted.

In the present study, according to the histometric analysis, the consumption of ascending concentrations of ethanol during 100 days by peripubertal rats caused a harmful impact on BL and BD in the presence of the ligature. These findings may suggest that ethanol intake may exacerbate the bone destruction induced by pathogens on alveolar bone. In fact, chronic alcohol consumption has been associated with a lower bone mineral content and BD in trabecular and cortical long bones, increasing the risk of osteoporotic fracture (Sampson et al., 1998; Shankar et al., 2006; Maurel et al., 2012). In addition, studies performed in growing rats indicate that chronic consumption of alcohol results in alterations in trabecular architecture and decreased cortical bone thickness (Wezeman et al., 1999; Turner et al., 2001). However, to date, there is no study regarding the effects of alcohol ingestion on alveolar BD. Although, the specific effects of *Cachaça* on periodontal tissues have not been previously reported, the present BL findings are in accordance with previous studies that evaluated the influence of ethanol on alveolar bone, using a similar ligature-induced periodontitis model. Souza et al. (2006, 2009) demonstrated a lower percentage of periodontal bone support and an increased BL in the ligated teeth of adult rats that ingested alcohol for 56 days. More recently, Dantas et al. (2012) observed a lower alveolar bone volume and an increased expression and activity of inducible nitric oxide synthase in the gingival tissue around ligatures in rats under short-term ethanol administration. On the other hand, other investigations did not demonstrate any effect of alcohol consumption upon alveolar bone. Irie et al. (2008) reported that chronic ethanol ingestion increased periodontal inflammation,

oxidative damage and TNF- α production, but did not affect ligature-induced bone resorption or apical migration of the junctional epithelium in adult rats. In addition, a previous study showed that alveolar BL around ligated teeth did not differ between animals that ingested low concentrations (ethanol 5% v/v) of ethanol and those that ingested tap water (Liberman et al., 2010). RANKL and OPG are well recognized as positive and negative controllers of osteoclastogenesis, respectively (Tanaka et al., 2005). In this study, the expressions of both RANKL and OPG were increased in the bone around the ligated teeth of the rats of the Ethanol group. However, the ratio of RANKL/OPG did not differ between the Ethanol and control groups. Based on the damaging effects of ethanol on BL and BD, a lower level of OPG and an increased ratio of RANKL/OPG in the Ethanol group were expected. Therefore, it is supposed that the unexpected finding regarding increased levels of OPG may be the result of a negative feedback in an attempt to control the osteoclastogenesis process caused by RANKL in alveolar bone damage, associated with alcohol and periodontitis.

This study also found an increased BL around the unligated teeth of the animals receiving ethanol, suggesting that this alcoholic beverage may cause BL by itself, regardless of the presence of biofilm. This result is in accordance with Irie et al (2008), who also showed a greater distance between the cement-enamel junction and the alveolar bone crest in teeth without the induction of periodontitis in rats that consumed a liquid diet containing ethanol at 36% of the total caloric value. On the other hand, other studies showed no significant differences in alveolar BL in the absence of biofilm challenge between the ethanol and control groups (Souza et al., 2006; Souza et al., 2009, Dantas et al., 2012). More interestingly, Liberman et al. (2010) showed that animals that ingested low concentrations of ethanol for nine weeks presented lower alveolar BL than control animals around teeth without ligatures.

Previous investigations have demonstrated an increase in the levels and activity of TRAP, a marker of osteoclasts, in the long bones of rats that ingested low (5%) or high (35%) quantities of ethanol (Shankar et al., 2006; Iitsuka et al., 2012). Unexpectedly, in this study, the animals submitted to ethanol consumption presented a lower number of TRAP+ cells in alveolar bone around the teeth with ligature, when compared to controls. To the authors' knowledge, there is no study evaluating the TRAP staining on alveolar bone in rats that ingested ethanol or other alcoholic beverages, which hampers a thorough comparison with the findings of the present study. In serum, the TRAP activity seems to be decreased in rats and humans that consumed ethanol (Maurel et al., 2012). It is worthy of note that this study evaluated the TRAP reaction products in a single stage after ligature placement (at 30 days) and ethanol consumption (at 100 days). Therefore, based on the negative impact of ethanol

ingestion on alveolar bone, confirmed by our histometric analyses, it is supposed that at any time before the sacrifice of the animals, ethanol probably increased the activity and the number of osteoclasts (i.e. the activity TRAP).

It is important clarify that the conflicting results among studies regarding the effects of alcohol on alveolar bone in the presence or absence of ligature may be related to the different experimental protocols. In this study, the ethanol was offered via drinking water without restriction of solid food, in attempt to mimic the alcohol consumption pattern in human (Lieber et al., 1989; Maurel et al., 2012). Other protocols of ethanol administration have been used by studies assessing the effects of alcohol upon bone tissues; these include intraperitoneal injections, admistration by gavage and liquid diet containing 35% of the calories as ethanol, named the Lieber-DeCarli liquid diet. However, intraperitoneal injections and gavage are stressful for the animals and may lead to inflammation and necrosis of tissues (Lieber et al., 1989). Although the Lieber-DeCarli liquid diet is widely used by in studies, it restricts the access to solid foods and, therefore, does not exactly simulate regular ethanol consumption in humans (Lieber et al., 2004; Mak et al., 2008). Another important issue is increase in animal age that occurs during the study, which may affect mechanical and content properties of the bone tissues, in association with alcohol consumption (Hogan et al., 1997; Hogan et al., 1999; Wezeman et al., 1999; Turner et al., 2001). In this study, the animals were in the peripubertal age while the majority of the other investigations used adult rats. Finally, differences in the number of animals per group, period of ligature permanence, dose and duration of ethanol ingestion and methods of bone evaluation may also contribute to the contradictory findings among the studies available in the literature.

Some mechanisms have been proposed to explain alcohol-related bone loss, including impairment of bone formation as well as activation of bone resorption (Farley et al., 1985; Friday and Howard, 1991; Cheung et al., 1995; Wezeman et al., 1999; Zhang et al., 2002; Callaci et al., 2009, Maurel et al., 2012). In humans, chronic alcohol abuse is associated with reductions in BD and in the number and function of osteoblasts (Marrone et al., 2012). *In vitro* and *in vivo* studies have suggested that the inhibition of bone formation is the primary mechanism of the deleterious effects of alcohol consumption on bone metabolism (Farley et al., 1985; Friday and Howard, 1991; Dyer et al., 1998; Wezeman et al., 1999; Turner et al., 2001). Bone cell proliferation, protein synthesis and alkaline phosphatase activity were reduced in a dose-dependent manner after exposure to ethanol (Farley et al., 1985; Friday and Howard, 1991, Dyer et al., 1998). On the other hand, other studies have suggested that the increased bone resorption activity is the main process by which alcohol consumption

negatively affects bone tissue (Cheung et al., 1995; Zhang et al., 2002; Callaci et al., 2009). Cheung et al. (1995) demonstrated that the number and extent of osteoclastic resorption were increased when bone-derived cells were cultured with ethanol (up 0.01%). Zhang et al. (2002) showed that OPG administration is able to diminish the ethanol-induced bone loss through its ability to abrogate osteoclastogenesis. Callaci et al. (2009) showed an increased expression of important regulators of maturation and osteoclastic activity, such as RANKL and interleukin (IL)-6, as well as decreased levels of OPG in the bone of rats after binge alcohol exposure. In conclusion, ethanol consumption per se, or in the presence of ligature, negatively affected alveolar bone by increasing the alveolar BL and reducing BD. These findings support the clinical data that indicate alcohol consumption as a risk indicator for periodontal diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank São Paulo State Research Foundation (São Paulo, São Paulo, Brazil) for financial support (# 2009/09446-6). There is no conflict of interest to declare.

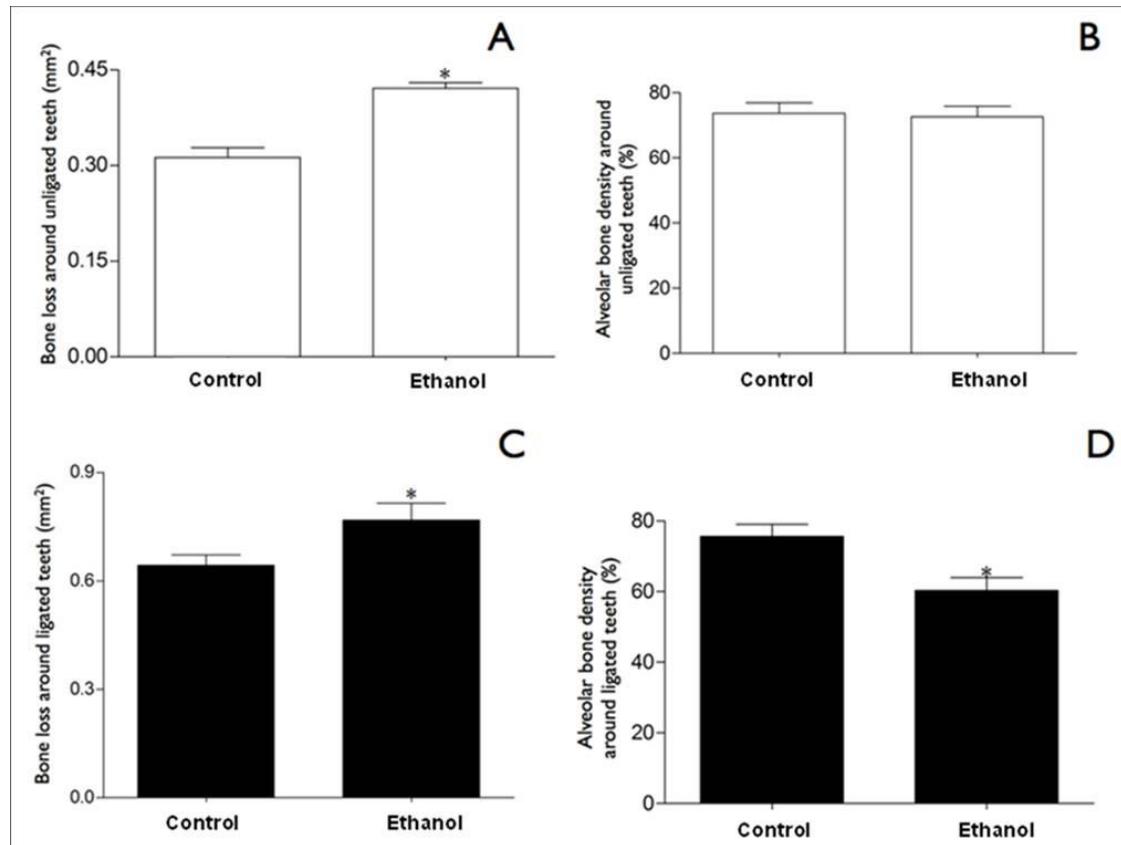


Figure 1. (A-D) Means (\pm SD) of the area between the interradicular bone crest and furcation root (BL/ mm^2) and bone density (BD,%) of Control and Ethanol groups. *Differences between groups by impaired Unpaired *t* test ($p<0.05$). White bars represent unligated teeth and Black bars represent ligated teeth.

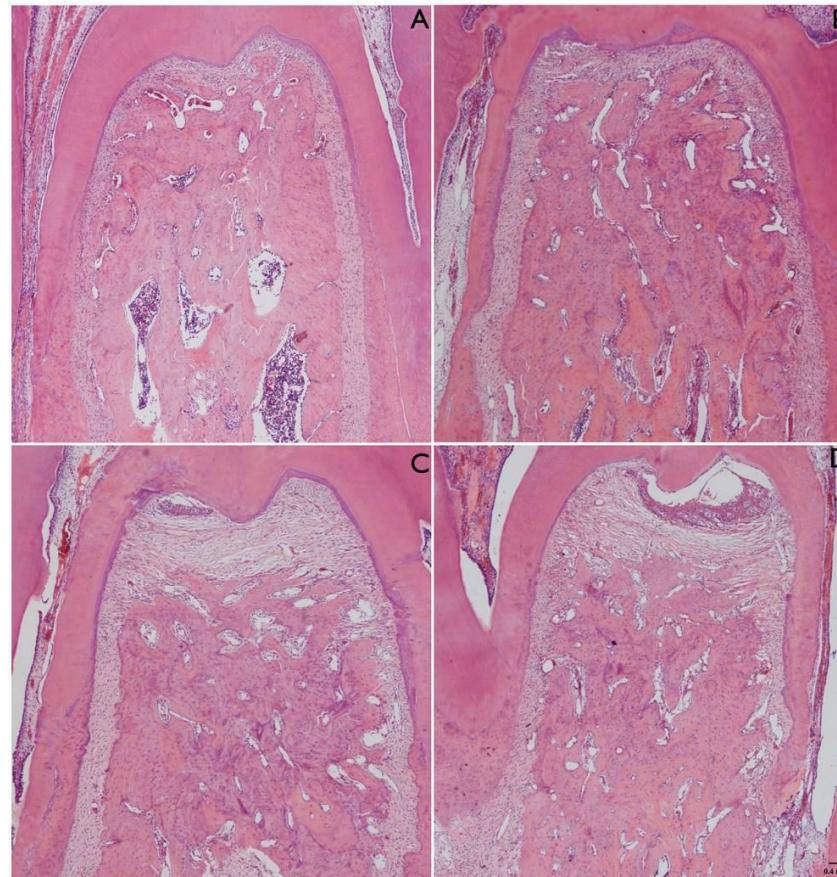


Figure 2. Photomicrographs illustrating the area between the interradicular bone crest and furcation root of unligated (A: Control and B: Ethanol) and ligated (C: Control and D: Ethanol) teeth of both groups (40x magnification).

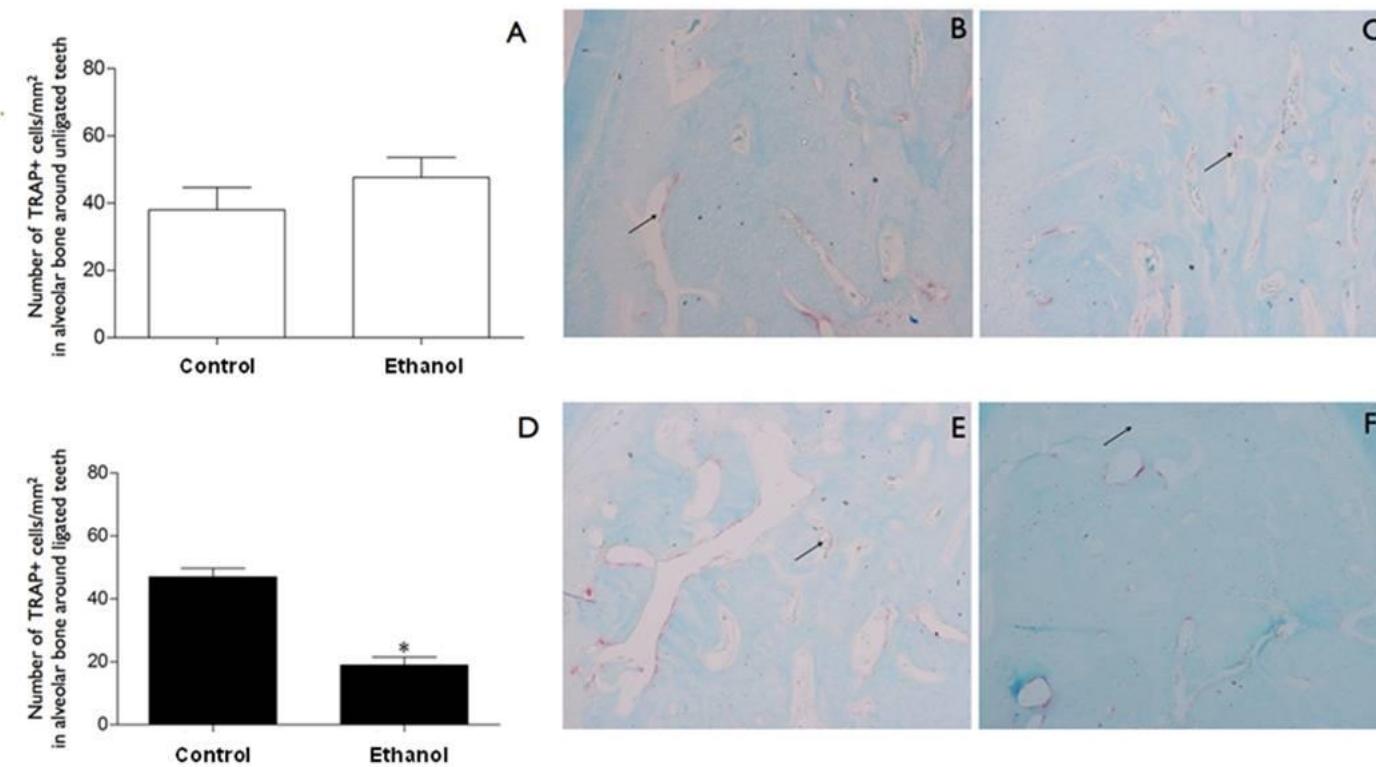


Figure 3. Means (\pm SD) number of TRAP+ cells/mm² of unligated (A) and ligated (D) teeth. Photomicrographs counterstained with Fast Green illustrating the TRAP+ cells around unligated (B: Control; C: Ethanol) and ligated (E: Control; F: Ethanol) teeth of both groups (100 x magnification). * Differences between groups by Unpaired *t* test ($p < 0.05$). The arrows illustrate the TRAP+ cells.

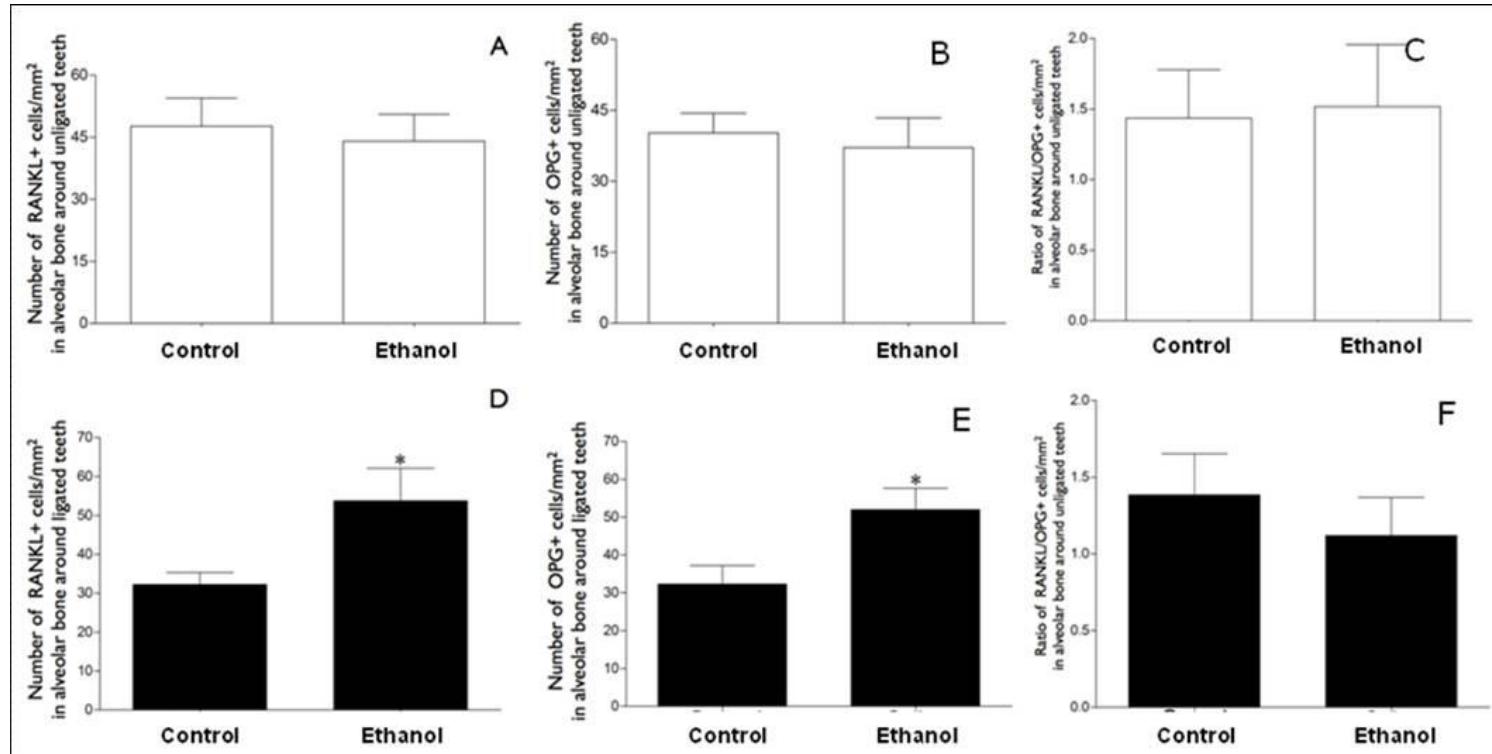


Figure 4. Means (\pm SD) number of RANKL⁺ (A,D), OPG⁺ (B,E) and ratio RANKL/OPG⁺ cells/mm² (C,F) for unligated (White bars) and ligated teeth (Black bars). * Differences between groups by Unpaired *t* test ($p<0.05$).

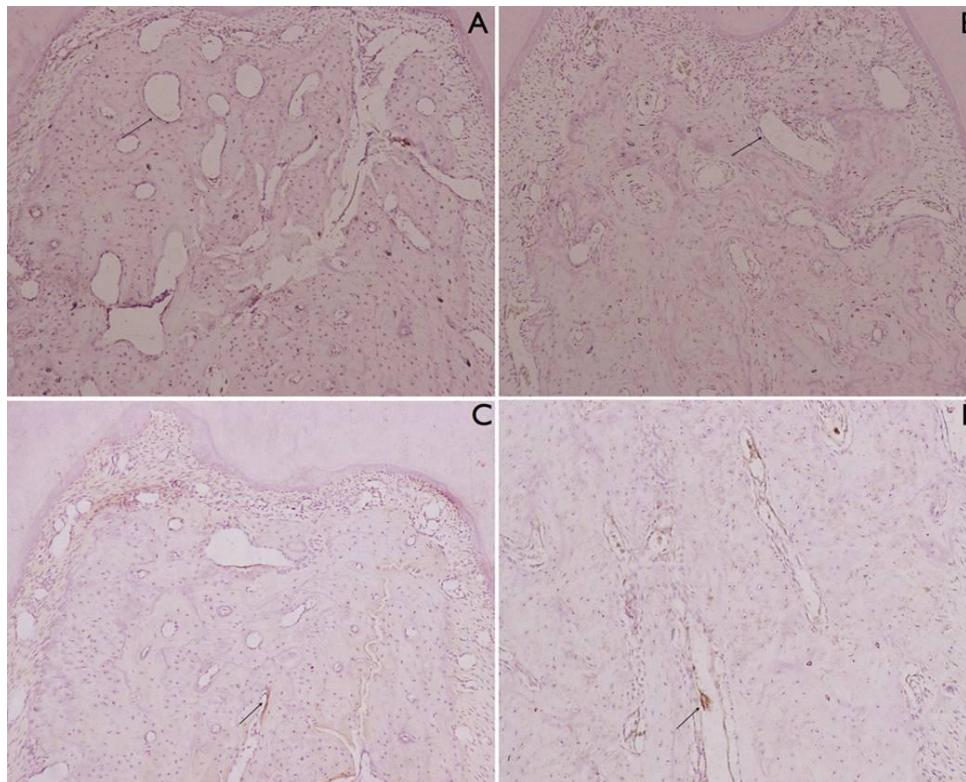


Figure 5. Photomicrographs counterstained with Mayer's hematoxylin illustrates the RANKL+ (A: Control ; B: Ethanol) and OPG+ (C: Control; D: Ethanol) cells around unligated teeth (100 x magnification). The arrows illustrate the RANKL or OPG + cells.

REFERENCES

1. World Health Organization. Global Status Report on Alcohol and Health 2011. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Available at:
http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/index.htm l.
Acessed November 29, 2012.
2. Boekeloo BO, Novik MG. Clinical approaches to improving alcohol education and counseling in adolescents and young adults. *Adolesc Med State Art Rev.* 2011 Dec; 22(3):631-48, xiv.
3. World Health Organization. The Americas profiles by WHO Region. Available at:
http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/index.htm
l. Acessed November 29, 2012.
4. Normative Instruction nº 13/2005 of 29 June 2005. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply of Brazil , Technical Regulation for the Establishment of Standards and Quality for Cachaça. *Diário Oficial da União:* Brasilia, 2005, 1, 3.
5. Decree nº 6871/2009 of 5 June 2009. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply of Brazil, Regulates Law 8918 of July 14, 1994, which provides directives for the standardization, classification, registration, inspection, and monitoring the production of beverages. *Diário Oficial da União:* Brasília, 2009, 1, 20.
6. Khocht A, Schleifer SJ, Janal MN, Keller S. Dental care and oral disease in alcohol-dependent persons. *J Subst Abuse Treat.* 2009 Sep;37(2):214-8.
7. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol.* 2001 Feb;72(2):183-9.
8. Tezal M, Wactawski-Wende J, Grossi SG, Ho AW, Dunford R, Genco RJ. The relationship between bone mineral density and periodontitis in postmenopausal women. *J Periodontol.* 2004 Sep;71(9):1492-8.

9. Novacek G, Plachetzky U, Pötzi R, Lentner S, Slavicek R, Gangl A, Ferenci P. Dental and periodontal disease in patients with cirrhosis--role of etiology of liver disease. *J Hepatol.* 1995 May;22(5):576-82.
10. Pitiphat W, Merchant AT, Rimm EB, Joshipura KJ. Alcohol consumption increases periodontitis risk. *J Dent Res.* 2003 Jul;82(7):509-13.
11. Nishida N, Tanaka M, Hayashi N, Nagata H, Takeshita T, Nakayama K, Morimoto K, Shizukuishi S. Association of ALDH(2) genotypes and alcohol consumption with periodontitis. *J Dent Res.* 2004 Feb;83(2):161-5.
12. Torrungruang K, Tamsailom S, Rojanasomsith K, Sutdhibhisal S, Nisapakultorn K, Vanichjakvong O, Prapakamol S, Premsirinirund T, Pusiri T, Jaratkulangkoon O, Unkurapinun N, Sritara P. Risk indicators of periodontal disease in older Thai adults. *J Periodontol.* 2005 Apr;76(4):558-65
13. Shimazaki Y, Saito T, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, Yamashita Y. Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama Study. *J Periodontol.* 2005 Sep;76(9):1534-41.
14. Larato DC. Oral tissue changes in the chronic alcoholic. *J Periodontol.* 1972 Dec;43(12):772-3.
15. Sakki TK, Knuutila ML, Vimpari SS, Hartikainen MS. Association of lifestyle with periodontal health. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1995 Jun;23(3):155-8.
16. Amaral C da S, Luiz RR, Leão AT. The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *J Periodontol.* 2008 Jun;79(6):993-8.
17. Souza DM, Ricardo LH, Prado Mde A, Prado Fde A, da Rocha RF. The effect of alcohol consumption on periodontal bone support in experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci.* 2006 Dec;14(6):443-7.

18. 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 Oct-Dec;23(4):460-6.
19. Irie K, Tomofuji T, Tamaki N, Sanbe T, Ekuni D, Azuma T, Maruyama T, Yamamoto T. Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. *J Dent Res.* 2008 May;87(5):456-60.
20. Dantas AM, Mohn CE, Burdet B, Zorrilla Zubilete M, Mandalunis PM, Elverdin JC, Fernández-Solari J. Ethanol consumption enhances periodontal inflammatory markers in rats. *Arch Oral Biol.* 2012 Sep;57(9):1211-7.
21. Liberman DN, Pilau RM, Gaio EJ, Orlandini LF, Rösing CK. Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. *Arch Oral Biol.* 2011 Feb;56(2):109-13.
22. Pereira MAS, Orsi AM, Molinari SL, Garcia PJ. Alcohol Effects on the Principal and Clear Cells of the Caput Epididymis of Albino Rats. *Anat. Histol. Embryol.* 32, 17–20 (2003).
23. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.* 2008 Oct;58(5):424-30.
24. Sampson HW, Hebert VA, Booé HL, Champney TH. Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: composition, morphology, and hormone levels of a rat animal model. *Alcohol Clin Exp Res* 1998;22:1746–53.
25. Shankar K, Hideström M, Haley R, Skinner RA, Hogue W, Jo CH, Simpson P, Lumpkin CK Jr, Aronson J, Badger TM, Ronis MJ. Different molecular mechanisms underlie ethanol-induced bone loss in cycling and pregnant rats. *Endocrinology.* 2006 Jan;147(1):166-78.

26. Maurel DB, Boisseau N, Benhamou CL, Jaffre C. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporos Int.* 2012 Jan;23(1):1-16.
27. Wezeman FH, Emanuele MA, Emanuele NV, Moskal SF 2nd, Woods M, Suri M, Steiner J, LaPaglia N. Chronic alcohol consumption during male rat adolescence impairs skeletal development through effects on osteoblast gene expression, bone mineral density, and bone strength. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999 Sep;23(9):1534-42.
28. Turner RT, Kidder LS, Kennedy A, Evans GL, Sibonga JD. Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adult female rats. *J Bone Miner Res.* 2001 Mar;16(3):589-94.
29. Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y. Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2005 Jun;4(3):325-8.
30. Itsuka N, Hie M, Nakanishi A, Tsukamoto I. Ethanol increases osteoclastogenesis associated with the increased expression of RANK, PU.1 and MITF in vitro and in vivo. *Int J Mol Med.* 2012 Jul;30(1):165-72.
31. Lieber CS, DeCarli LM, Sorrell MF. Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology.* 1989 Oct;10(4):501-10.
32. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, Ponomarenko A, DeCarli LM. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr.* 2004 Mar;79(3):502-9.
33. Mak KM, Ren C, Ponomarenko A, Cao Q, Lieber CS. Adipose differentiation-related protein is a reliable lipid droplet marker in alcoholic fatty liver of rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008 Apr;32(4):683-9.
34. Hogan HA, Sampson HW, Cashier E, Ledoux N. Alcohol consumption by young actively growing rats. A study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997 Aug;21 (5): 809-16.

35. Hogan HA, Groves JA, Sampson HW. Long term alcohol consumption in the rat affects fémur cross-sectional geometry and bone tissue material properties. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999 Nov; 23 (11): 1825-33.
36. Wezeman FH, Emanuele MA, Emanuele NV, Moskal SF 2nd, Woods M, Suri M, Steiner J, LaPaglia N. Chronic alcohol consumption during male rat adolescence impairs skeletal development through effects on osteoblast gene expression, bone mineral density, and bone strength. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999 Sep; 23 (9): 1534-42.
37. Farley JR, Fitzsimmons R, Taylor AK, Jorch UM, Lau KH. Direct effects of ethanol on bone resorption and formation in vitro. *Arch Biochem Biophys.* 1985 Apr;238(1):305-14.
38. Friday KE, Howard GA. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. *Metabolism.* 1991 Jun;40(6):562-5.
39. Cheung RC, Gray C, Boyde A, Jones SJ. Effects of ethanol on bone cells in vitro resulting in increased resorption. *Bone.* 1995 Jan;16(1):143-7.
40. Zhang J, Dai J, Lin DL, Habib P, Smith P, Murtha J, Fu Z, Yao Z, Qi Y, Keller ET. Osteoprotegerin abrogates chronic alcohol ingestion-induced bone loss in mice. *J Bone Miner Res.* 2002 Jul;17(7):1256-63.
41. 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.
42. Dyer SA, Buckendahl P, Sampson HW. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol.* 1998 Nov;16(4):337-41.

4. CONCLUSÃO

O consumo crônico de etanol, por si só ou na presença da ligadura, afetou negativamente o osso alveolar por aumentar a perda óssea alveolar. E em associação com a ligadura, o consumo crônico de etanol promoveu a diminuição da densidade óssea alveolar. Estes resultados sugerem que o consumo crônico de etanol pode influenciar a severidade da doença periodontal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;13:390(6656):175-9.
- Amaral Cda S, Luiz RR, Leão AT. The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *J Periodontol*. 2008;79(6):993-8.
- Amaral Cda S, Vettore MV, Leão A. The relationship of alcohol dependence and alcohol consumption with periodontitis: a systematic review. *J Dent*. 2009;37(9):643-51.
- Amaral Cda S, da Silva-Boghossian CM, Leão AT, Colombo AP. Evaluation of the subgingival microbiota of alcoholic and non-alcoholic individuals. *J Dent*. 2011;39(11):729-38.
- Bezerra JP, da Silva LR, de Alvarenga Lemos VA, Duarte PM, Bastos MF. Administration of high doses of caffeine increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontol*. 2008;79(12):2356-60.
- Bombonato-Prado KF, Brentegani LG, Thomazini JA, Lachat JJ, Carvalho TL. Alcohol intake and osseointegration around implants: a histometric and scanning electron microscopy study. *Implant Dent*. 2004;13(3):238-44.
- Bonato CF, do-Amaral CC, Belini L, Salzedas LM, Oliveira SH. Hypertension favors the inflammatory process in rats with experimentally induced periodontitis. *J Periodontal Res*. 2012;47(6):783-92.
- Bouchard P, Boutouyrie P, Mattout C, Bourgeois D. Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. *J Periodontol*. 2006;77(3):479-89.
- Boyce BF, Xing L. Functions of the RANK/RANKL/OPG in bone modelling and remodelling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473:139-146.
- Calder JD, Butterly L, Revell PA, Pearse M, Polak JM. Apoptosis-a significant cause of bone cell death in osteonecrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br*. 2004;86(8):1209-13.
- Callaci JJ, Juknelis D, Patwardhan A, Sartori M, Frost N, Wezeman FH. The effects of binge alcohol exposure on bone resorption and biomechanical and structural properties are offset by concurrent bisphosphonate treatment. *Alcohol Clin Exp Res*. 2004;28(1):182-91.
- Chahaieb JA. Associação tabagismo-alcoolismo: introduções às grandes dependências humanas. *Rev. Saúde Pública*. 1998;32(3):246-54.

- Chen G, Sirkar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani S. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer.* 2006;107:289-98.
- Coelho RB, Goncalves Junior R, Granjeiro JM, Barboza EP, Casado PL. Correlação entre consumo de álcool e doença peri-implantar: estudo clínico e radiográfico. *Braz J Periodontol.* 2011;21(2):57-64.
- Cui Q, Wang Y, Saleh KJ, Wang GJ, Balian G. Alcohol-induced adipogenesis in a cloned bone-marrow stem cell. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88 Suppl 3:148-54.
- Dai J, Lin D, Zhang J, Habib P, Smith P, Murtha J, Fu Z, Yao Z, Qi Y, Keller ET. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J Clin Invest.* 2000;106(7):887-95.
- Dantas AM, Mohn CE, Burdet B, Zorrilla Zubilete M, Mandalunis PM, Elverdin JC, Fernández-Solari J. Ethanol consumption enhances periodontal inflammatory markers in rats. *Arch Oral Biol.* 2012;57(9):1211-7.
- Del Fattore A, Peruzzi B, Rucci N et al. Clinical, genetic, and cellular analysis of 49 osteopetrotic patients: implications for diagnosis and treatment. *J Med Genet.* 2006;43:315-325.
- Del Fattore A, Cappariello A, Teti A. Genetics, pathogenesis and complications of osteopetrosis. *Bone.* 2008;42:19-29.
- DeLorenze GN, Weisner C, Tsai A, Satre DD, Quesenberry Jr CP. Excess Mortality Among HIV-Infected Patients Diagnosed With Substance Use Dependence or Abuse Receiving Care in a Fully Integrated Medical Care Program. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011;35(2):203-210.
- Dhadse P, Gattani D, Mishra R. The link between periodontal disease and cardiovascular disease: How far we have come in last two decades? *J Indian Soc Periodontol.* 2010;14(3):148-54.
- Do THT, Gaboriau F, Ropert M, Moirand R, Cannie I, Brissot P, Loréal O, Lescoat G. Ethanol Effect on Cell Proliferation in the Human Hepatoma Hepa RG Cell Line: Relationship with Iron Metabolism. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011;35(3):408-419.
- Everts, V., Delaissé, J. M., Körper, W., Niehof, A., Vaes, G. and Beertsen, W. Degradation of collagen in the the bone-resorbing compartment underlying the osteoclast involves both cysteine proteinases and matrix metalloproteinases. *J. Cell. Physiol.* 1992;150:221-231.
- Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell.* 2000;103:41-50.
- Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas.* 2008;60:65-69.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal diseases. *J Periodontol.* 1996;64:1041-9.

Global Information System on Alcohol and Health-OMS; World Health Organization. 2012 Dez:1-1.

Grossi SG, Genco RJ, Machtei EE. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol.* 1995;66(1):23-29.

Habermann B, Eberhardt C, Feld M, Zichner L, Kurth A. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase cement less total hip replacement. *Acta Orthop.* 2007;78:221-5.

Hayman AR. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity.* 2008;41(3):218-23. Review.

Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA.* 2004;292(4):490-5. Review.

Holm S, Mackiewicz Z, Holm AK, Konttinen YT, Kouri VP, Indahl A, Salo J. Pro-inflammatory, pleiotropic, and anti-inflammatory TNF-alpha, IL-6, and IL-10 in experimental porcine intervertebral disk degeneration. *Vet Pathol.* 2009;46(6):292-300.

Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol 2000.* 2006;41:48-72. Review.

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

Jung MK, Callaci JJ, Lauing KL, Otis JS, Radek KA, Jones MK, and Kovacs EJ. Alcohol Exposure and Mechanisms of Tissue Injury and Repair Alcohol. *Clin Exp Res.* 2011;35(3):392-399.

Khocht A, Schleifer SJ, Janal MN, Keller S. Dental care and oral disease in alcohol-dependent persons. *J Subst Abuse Treat.* 2009;37(2):214-8.

Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JM, Niforas P, Ng KW, Martin TJ, Gillespie MT. Localization of RANKL (receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. *Bone.* 1999;25(5):525-34.

Kim NS, Kim HJ, Koo BK, Kwon MC, Kim YW, Cho Y, et al. Receptor activator of NF-Kappa B ligand regulates the proliferation of mammary epithelial cells via Id2. *Mol Cell Biol.* 2006;26:1002-13.

Khaled E.G, Saleh M, Hindocha S, Griffin M, Khan WS. Tissue Engineering for Bone Production- Stem Cells, Gene Therapy and Scaffolds. *Open Orthop J.* 2011;5:289-295.

Kobayashi M, Matsumoto C, Hirata M, Tominari T, Inada M, Miyaura C. The correlation between postmenopausal osteoporosis and inflammatory periodontitis regarding bone loss in experimental models. *Exp Anim.* 2012;61(2):183-7.

Khosla S: Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology.* 2001;142: 5050-5055.

Kraus D, Winter J, Jepsen S, Jäger A, Meyer R, Deschner J. Interactions of adiponectin and lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* on human oral epithelial cells. *PLoS One.* 2012;7(2):307-316.

Lages EJ, Costa FO, Lages EM, Cota LO, Cortelli SC, Nobre-Franco GC, Cyrino RM, Cortelli JR. Risk variables in the association between frequency of alcohol consumption and periodontitis. *J ClinPeriodontol.* 2012;39(2):115-22.

Leibbrandt A, Penniger J. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1143:123-130.

Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol.* 1985;56:447-456.

Mackiewicz Z, Niklińska WE, Kowalewska J, Chyczewski L. Bone as a source of organism vitality and regeneration. *Folia HistochemCytobiol.* 2011;49(4):558-69.

Maddalozzo GF, Turner RT, Edwards CH, Howe KS, Widrick JJ, Rosen CJ, Iwaniec UT. Alcohol alters whole body composition, inhibits bone formation, and increases bone marrow adiposity in rats. *Osteoporos Int.* 2009;20(9):1529-38.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000;21(2):115-37. Review.

Mercer KE, Wynne RA, Lazarenko OP, Lumpkin CK, Hogue WR, Suva LJ, Chen JR, Mason AZ, Badger TM, Ronis MJ. Vitamin D supplementation protects against bone loss associated with chronic alcohol administration in female mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2012;343(2):401-12.

Mirosavljevic D, Quinn JM, Elliott J, Horwood NJ, Martin TJ, Gillespie MT: T-cells mediate an inhibitory effect of interleukin-4 on osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res.* 2003;18:984-993

Miyamoto T. Regulators of Osteoclast Differentiation and Cell–Cell Fusion. *Keio J Med.* 2011;60(4):101-105.

Mulligan MK, Rhodes JS, Crabbe JC, Mayfield RD, Harris RA, Ponomarev I. Molecular Profiles of Drinking Alcohol to Intoxication in C57BL/6J Mice. *Alcohol ClinExp Res.* 2011;35(4):659-670.

Noble BS, Peet N, Stevens HY, Brabbs A, Mosley JR, Reilly GC, Reeve J, Skerry TM, Lanyon LE. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol.* 2003;284:C934-C944.

Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontol 2000.* 2003;32:11-23.

Organización Mundial de la Salud; Ministerio de sanidad y consumo centro de publicaciones. Lexicon of Alcohol and Drug Terms. Madrid (Espana); 1994.

Organización Mundial de la Salud. Neurociencia del Consumo y Dependencia de Sustancias Psicoactivas: Resumen. Ginebra (Suiza); 2004.

Organización Panamericana de la Salud. Alcohol, género, cultura y daños en las Américas: reporte final del estudio multicéntrico OPS. Washington (D.C); 2007.

Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976;34:235-249.

Peruzzo DC, Benatti BB, Antunes IB, Andersen ML, Sallum EA, Casati MZ, Nociti FH, Nogueira-Filho GR. Chronic stress may modulate periodontal disease: a study in rats. *J Periodontol.* 2008;79(4):697-704.

Pitiphat W, Merchant AT, Rimm EB, Joshipura KJ. Alcohol consumption increases periodontitis risk. *J Dent Res.* 2003;82(7):509-13

Rauner M, Sipos W, Pietschmann Peter. Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol* 2007;143:31-48.

Rehm J, Baliunas D, Borges GL, Graham K, Irving H, Kehoe T, Parry CD, Patra J, Popova S, Poznyak V, Roerecke M, Room R, Samokhvalov AV, Taylor B. The relation between different dimensions of alcohol consumption and burden of disease: an overview. *Addiction.* 2010;105(5):817-43.

Roberts HC, Knott L, Avery NC, Cox TM, Evans MJ, Hayman AR. Altered collagen in tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-deficient mice: a role for TRAP in bone collagen metabolism. *Calcif Tissue Int.* 2007;80:400-0

SAMHSA, U.S. Substance Abuse and Mental Health Services Administration; Department of Health and Human Services. National Survey on Drug Use and Health (NSDUH): Summary of national findings. Results from the 2011. United States of America; 2012.

Schnitzler CM, Mesquita JM, Shires R. Cortical and trabecular bone microarchitecture and turnover in alcohol-induced chronic pancreatitis: a histomorphometric study. *J Bone Miner Metab.* 2010;28(4):456-67.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25(2):134-44.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000.* 2002;28:12-55. Review.

Sommer I, Erkkilä AT, Järvinen R, Mursu J, Sirola J, Jurvelin JS, Kröger H, Tuppurainen M. Alcoholconsumption and bone mineral density in elderly women. *Public Health Nutr.* 2012;17:1-9.

de Souza DM, Ricardo LH, Prado Mde A, Prado Fde A, da 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.

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.

SoysaNS, Alles N. NF Kappa Beta functions in osteoclast. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378:1-5.

Suh KT, Kim SW, Roh HL, Youn MS, Jung JS. Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;431:220-5.

Taylor B, Rehm J, Aburto, JTC, Bejarano J, Cayetano C, Kerr-Correia F, Ferrand M P, Gmel G, Graham K, Greenfield TK, Laranjeira R, Lima MC, Magri R, Monteiro M G, Medina Mora ME, Munné M, Romero MP, Tucci AM, Wilsnack S. Alcohol, gender, culture and harms in the Americas: PAHO Multicentric Study final report. Washington, D.C: Pan American Health Organization. 2007.

Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol.* 2001;72(2):183-9.

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(7):484-8.

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

Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T: Origin of osteoclasts: Mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87: 7260-7264.

Venkat KK, Arora MM, Singh P, Desai M, Khatkhatay I. Effect of alcohol consumption on bone mineral density and hormonal parameters in physically active male soldiers. *Bone*. 2009;45:449-454.

Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*. 2006;12:17-5.

Wong BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, Kalachikov S, Cayani E, Bartlett FS 3rd, Frankel WN, Lee SY, Choi Y. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem*. 1997;272(40):25190-4.

Wright HL, McCarthy, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and Osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2009;2:56-4.

Yun TJ, Chaudhary PM, Shu GL, Frazer JK, Ewings MK, Schwartz SM, Pascual V, Hood LE, Clark EA: OPG/FDCR-1, a TNF receptor family member, is expressed in lymphoid cells and is up-regulated by ligating CD40. *J Immunol* 1998;161:6113-6121.

Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol*. 1996;1(1):879-925. Review.