

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁLCOOL EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES NA
PERDA ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS WISTAR**

DIEGO NIQUE LIBERMAN

Porto Alegre, Dezembro de 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

LINHA DE PESQUISA : Epidemiologia, etiopatogenia e repercussão das doenças da cavidade bucal e estruturas anexas.

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO ÁLCOOL EM BAIXAS CONCENTRAÇÕES NA PERDA ÓSSEA ALVEOLAR EM RATOS WISTAR

DIEGO NIQUE LIBERMAN

Orientador : Prof. Dr. CASSIANO KUCHENBECKER RÖSING

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de mestre em Clínica Odontológica.

Porto Alegre, Dezembro de 2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Claudio Orlando Liberman e Liamara Nique Liberman, por todos os seus esforços para que eu pudesse ter uma educação de qualidade. Pelo apoio, pelo exemplo de caráter e pelo carinho de vocês.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais Claudio e Liamara, que sempre estiveram do meu lado, que foram impecáveis nos seus papéis de educadores e de me proporcionar todas as oportunidades que tenho hoje. Difícil colocar em palavras todo o carinho que tive de vocês ao longo de minha vida e de todo o apoio que vocês seguem me dando para enfrentar as novas etapas da minha trajetória. Vocês definitivamente seguem o princípio de que “não basta ser pai e mãe, tem que participar” !! Obrigado por tudo!

A todos os meus familiares brasileiros e argentinos, que nunca hesitaram em participar e vivenciar comigo meus momentos de alegria. Os nomes de todos completariam muitas páginas destes agradecimentos. Portanto, prefiro dizer que cada um de vocês sabe a admiração e o carinho que tenho por cada um.

Ao meu orientador, Prof. Cassiano Kuchenbecker Rösing, pela tua amizade e dedicação que tens à Faculdade de Odontologia UFRGS e ao teu orientado. É uma grande honra trabalhar contigo desde os tempos de Semana Acadêmica, passando pelo trabalho de conclusão do curso de especialização e pela tese de mestrado. Só posso te desejar muita saúde para que continues com esse pique todo!

Ao Prof. Rui Oppermann, hoje vice-reitor da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, posso dizer que uma das melhores aulas que tive e que levo para a minha vida foi o relato da tua brilhante trajetória durante uma das atividades do mestrado.

Aos professores de periodontia, Marilene Fernandes, Cristiano Susin, Fernando Daudt, Patrícia Weidlich e Alex Haas pela amizade, pela convivência pelo aprendizado que tive com vocês.

Aos amigos que fiz no CREAL (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório). À médica veterinária Lorena Floriani Orlandini, sem tua ajuda e tua competência, os caminhos para elaboração desta tese seriam, definitivamente, muito mais difíceis. Obrigado pela parceria, pela amizade e pela tua

dedicação! À conhecida “Dona Geni”, que sempre me foi muito atenciosa, simpática e cooperativa para o andamento deste estudo. Obrigado pela tua dedicação!

Ao doutorando Eduardo José Gaio, pela tua grande ajuda, tua amizade e pelo brilhante papel na colocação das ligaduras (100% de aproveitamento). Ao mestrando Juliano Cavagni pela tua disposição para debater, conversar e ajudar. Ambos companheiros do “Projeto Obesidade”.

À Roberta Pilau, que realizou o seu trabalho de conclusão de curso junto com este projeto e que esteve sempre envolvida e participativa com o levantamento de questionamentos importantes. Obrigado pela amizade e pela tua ajuda!

Ao doutorando Tiago Fiorini. Aos meus colegas mestrandos José Mariano da Rocha e Marta Musskopf. A todos os bolsistas de iniciação científica, em especial aos que estiveram envolvidos no “Projeto Obesidade” (Fernando Rios, Ricardo Costa, Guilherme Garcez, Alessandro Santana, Paula Segatto e Francine Seleme). Obrigado pela amizade de vocês todos vocês!

À Liane Musskopf, pela tua ajuda, tua amizade e tua excelente companhia dentro do “Projeto Obesidade”.

Meus sinceros abraços de agradecimento e meu desejo de saúde a todos vocês!

Diego Nique Liberman

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1. Considerações Iniciais.....	13
2. Definições acerca do consumo de bebidas alcoólicas.....	15
3. Mecanismos de ação do álcool na modulação do sistema imune.....	16
4. Mecanismos de modulação do álcool na resposta inflamatória.....	18
5. Riscos do consumo de álcool para a saúde geral.....	19
6. Benefícios do consumo moderado de álcool.....	19
7. Plausibilidade biológica para a relação do consumo de álcool com as doenças periodontais destrutivas.....	21
8. Associação do álcool com as doenças periodontais em humanos.....	21
9. Associação do álcool com as doenças periodontais : estudos em modelo animal.....	26
9.1 Métodos de administração de álcool em ratos.....	29
9.2 Métodos de avaliação da perda óssea alveolar em modelo animal.....	30
10. Objetivos.....	32
MANUSCRITO I.....	33
ANEXO I – MANUSCRITO I.....	48
ANEXO II – MANUSCRITO I.....	49
MANUSCRITO II.....	50
ANEXO I – MANUSCRITO II.....	61

<i>ANEXO II – MANUSCRITO II</i>	62
<i>ANEXO III – MANUSCRITO II</i>	63
<i>ANEXO IV – MANUSCRITO II</i>	64
<i>CONSIDERAÇÕES FINAIS</i>	65
<i>REFERÊNCIAS</i>	68

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação compõe-se de dois artigos intitulados: ***Low-dose alcohol intake may inhibit alveolar bone loss in Wistar rats*** e ***Comparison of two methods for alveolar bone loss measurement in an experimental periodontal disease model in rats***. Além dos artigos, uma introdução geral e Considerações Finais são apresentadas, de acordo com a Resolução N.º 093/2007 da Câmara de Pós Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RESUMO

A relação entre o álcool e as doenças periodontais destrutivas tem sido avaliada em humanos através de estudos transversais e longitudinais na última década. As investigações apontam para resultados conflitantes sobre a influência do consumo de bebidas alcoólicas na progressão da periodontite. Em quatro estudos recentes realizados em ratos Wistar, o consumo de álcool com concentrações entre 10% e 30% esteve associado a uma maior perda óssea alveolar. Nestes estudos, os métodos de avaliação da perda óssea alveolar em estudos de modelo animal tem sido realizados de formas distintas, impedindo uma comparação direta em investigações que utilizaram diferentes concentrações de álcool. Contudo, a literatura tem correlacionado o consumo de concentrações moderadas de bebidas alcoólicas com uma melhora no sistema imunológico e uma redução em marcadores inflamatórios sistêmicos, reduzindo a ocorrência de eventos cardiovasculares e aterosclerose. O mecanismo de atuação do álcool nestes parâmetros parece ser ambíguo e dependente da dose, do padrão de consumo e de características individuais variáveis. Os resultados conflitantes sobre a relação entre consumo de bebidas alcoólicas e doença periodontal podem sugerir esse padrão bifásico do álcool. Não existem estudos em modelo animal que avaliaram o impacto da administração de concentrações menores de álcool sobre a perda óssea alveolar. A discussão acerca de metodologias adequadas para estudos em animais e interpretação dos resultados encontra-se limitada em poucos estudos. A presente tese propôs-se a avaliar o impacto do consumo de álcool numa concentração de 5% na destruição periodontal em um modelo de periodontite induzida por ligaduras em ratos Wistar. Uma comparação entre dois métodos distintos para a quantificação da perda óssea alveolar também foi realizada. Através de uma avaliação morfométrica, tanto linear quanto de área, verificou-se que os ratos que receberam etanol em uma concentração de 5% apresentaram uma menor perda óssea do que os ratos do grupo controle em dentes que não receberam ligadura (0.32 ± 0.07 e 0.37 ± 0.07 respectivamente; $p=0.04$). Apesar da menor perda óssea apresentada pelos ratos do grupo teste também nos dentes que haviam recebido ligadura, tais diferenças não

foram estatisticamente significantes (0.78 ± 0.14 e 0.84 ± 0.18 respectivamente; $p=0.14$). Um valor de Correlação de Pearson de 0.98 foi encontrado entre os métodos de avaliação de perda óssea alveolar lineares e de área, indicando de uma correlação quase perfeita. Sendo assim, ambos os métodos revelaram eficazes na detecção de alterações na crista óssea alveolar. Os resultados do presente estudo revelam que o consumo de álcool em concentrações moderadas (5%) pode inibir a perda óssea alveolar em ratos Wistar.

Palavras-chave : perda óssea alveolar, periodontites, consumo de álcool, modelos em animais.

ABSTRACT

The relationship between alcohol and periodontal disease have been evaluated in humans throughout cross-sectional and longitudinal studies in the last decade. The investigations have led to conflicting results about the influence of alcohol drinking on periodontitis progression. In four studies with Wistar rats, alcohol consumption in concentrations ranging between 10% to 30% was associated with greater alveolar bone loss. In these studies, different methods of bone loss evaluation have been used in animal model studies and it turns difficult to make a direct comparison between investigations that utilized different alcohol concentrations. However, the literature has associated moderate alcohol consumption with improvement in immunological status and reduction in inflammatory markers, reducing cardiovascular events and atherosclerosis. The mechanisms by which alcohol influences these parameters seems to be ambiguous and dependent of dose, pattern of consumption and individual characteristics. The conflicting results between beverage consumption and periodontal disease may suggest the biphasic pattern of alcohol. There aren't studies in animal models that evaluated the impact of low alcohol concentrations on alveolar bone loss. Discussion about methodological issues and results interpretation in relation to studies in animals are restricted to few studies. The aim of the present thesis was to evaluate the impact of alcohol consumption in a concentration of 5% on periodontal breakdown in a ligature periodontitis-induced model. Also, a comparison between two distinct methods for bone loss assessment was evaluated. Linear and area morphometric evaluation revealed that rats receiving ethanol 5% presented less alveolar bone loss than rats in control group in unligated teeth (0.32 ± 0.07 and 0.37 ± 0.07 respectively; $p=0.04$). Despite the fact that rats in test group presented less alveolar bone loss even in ligated teeth when compared to controls, differences were no statistically significantly (0.78 ± 0.14 and 0.84 ± 0.18 respectively; $p=0.14$). A value of 0.98 were found in Pearson's Correlation between linear and area morphometric methods of evaluating alveolar bone loss indicating an almost perfect correlation. Both methods were reliable for detecting alterations in alveolar bone crest. The results of the present

study revealed that alcohol consumption in moderate concentrations (5%) may inhibit alveolar bone loss in Wistar rats.

Keywords : alveolar bone loss, periodontitis, alcohol drinking, animal model

INTRODUÇÃO GERAL

O presente trabalho trata de dois estudos sobre patogênese da destruição periodontal em ratos Wistar. A presente introdução geral foca em tópicos desenvolvidos no decorrer do trabalho.

1.Considerações Iniciais

Uma das primeiras observações sobre os possíveis efeitos deletérios do álcool sobre a saúde geral ocorreu no ano de 1795, quando Benjamin Rush constatou uma maior suscetibilidade a ocorrência da Tuberculose em pessoas alcoólicas. Já no século 19, durante uma epidemia de cólera ocorrida no ano de 1884, observou-se maior ocorrência de mortes entre alcoólatras (Szabo e Mandrekar, 2009). Atualmente, Organização Mundial da Saúde relaciona o abuso no consumo de bebidas alcoólicas como causa da ocorrência de mais de 60 tipos de doença (Who, 2004). Entretanto, uma nova linha de pensamento sobre os possíveis benefícios do consumo moderado de álcool iniciou-se no final dos anos 50 com “O estudo dos sete países” (Keys, 1980). Desde então, inúmeros estudos epidemiológicos têm apontado para uma relação inversa entre o consumo moderado de álcool e o risco de morbidade ou mortalidade cardiovascular (Romeo, Warnberg, Nova, Diaz, Gomez-Martinez *et al.*, 2007).

Estimativa recente realizada pela Organização Mundial de Saúde aponta para um número de aproximadamente 2 bilhões de pessoas em todo o mundo que sejam consumidoras de bebidas alcoólicas. Segundo o mesmo relatório, no ano de 2001, o consumo de álcool puro *per capita* no mundo ultrapassou os 5 litros sendo que a cerveja, bebida mais apreciada do mundo, foi responsável pela ingestão *per capita* de cerca de 2 litros de álcool puro. O Brasil ocupa a 81ª posição no ranking mundial de países com maior consumo de álcool com um valor per capita de 5,32 litros de álcool puro (Who, 2004). Um recente levantamento (Laranjeira, Pinsky *et al.*, 2009) realizado com uma população adulta maior de 18 anos em 143 cidades brasileiras

em uma amostra representativa do Brasil revelou que o país tem um grande percentual de abstêmios (47%). Contudo, os mesmos autores chamam a atenção para um padrão de consumo de bebidas alcoólicas considerado nocivo para a saúde e capaz de gerar dependência: 29% das pessoas que afirmaram consumir bebidas alcoólicas o faziam em uma dose alta (acima de 5 drinques por dia) e 28% revelaram ter consumido altas doses de bebida em pelo menos uma ocasião específica (termo em inglês definido como “binge drinking”).

Os métodos utilizados para avaliação da quantidade de ingestão de bebidas alcoólicas e também o padrão em que estas bebidas são consumidas (Rehm, Greenfield *et al.*, 1999) tornam-se importantes a partir dos recentes achados sobre a função modulatória do álcool em funções importantes do organismo humano como o sistema de defesa (Gamble, Mason *et al.*, 2006; Szabo e Mandrekar, 2009) e a resposta inflamatória (Romeo, Warnberg, Nova, Diaz, Gomez-Martinez *et al.*, 2007). Em relação a sua ação no sistema imune, alguns autores descrevem a ação do álcool como bifásica em que baixas doses resultariam em estimulação das células de defesa ao passo que altas doses provocariam um efeito inibitório nas mesmas (Calabrese e Baldwin, 2003). Em relação à resposta inflamatória, foi verificado que diferentes tipos de bebidas alcoólicas tiveram potenciais similares de inibição da resposta inflamatória mediante ingestão de vodka ou cerveja (Mandrekar, Catalano *et al.*, 2006; Romeo, Warnberg, Nova, Diaz, Gonzalez-Gross *et al.*, 2007).

De maneira geral, a relação do álcool com a saúde geral é influenciada por diversos fatores como o padrão de consumo, quantidade e tipo de álcool, por idade e sexo (Gronbaek, 2004; Romeo, Warnberg, Nova, Diaz, Gomez-Martinez *et al.*, 2007). Sabe-se que em quantidades similares de ingestão de álcool, mulheres apresentam maiores níveis da substância no sangue quando comparadas aos homens, visto que o metabolismo da substância no estômago é mais baixo no sexo feminino (Kloner e Rezkalla, 2007). Portanto, deve-se ter cautela na definição de níveis de consumo de bebidas alcoólicas que representem melhoras na condição de saúde já que existe uma suscetibilidade individual aos efeitos do álcool (Thakker, 1998).

A literatura ainda não apresenta um consenso em relação a um maior benefício para a saúde no consumo de determinado tipo de bebida alcoólica (Diaz, Montero *et al.*, 2002). Apesar disto, um estudo (Gronbaek, Becker *et al.*, 2000) que avaliou o risco de morte por diversas causas com estratificação para o tipo de bebida observou que participantes que tinham como hábito o consumo moderado de vinho (8 a 21 taças por semana) tiveram um risco relativo de morte de 0.76 (95% IC, 0.67-0.86) ao passo que o consumo leve a moderado de cerveja (RR 0.99; 95% IC, 0.90-1.09) ou destilados (RR 1.02; 95% IC, 0.90-1.15) demonstrou um efeito modesto ou inexistente na redução da mortalidade. Em relação aos benefícios do álcool no sistema cardiovascular, a preponderância de dados sugere que 1 a 2 drinques por dia para homens e 1 drinque por dia para mulheres seja benéfico para a saúde (Kloner e Rezkalla, 2007).

2. Definições acerca do consumo de bebidas alcoólicas

Apesar dos inúmeros estudos sobre riscos e benefícios do álcool existentes na literatura, fica evidente que as definições acerca da quantidade de álcool presente em um drinque varia marcadamente de acordo com o artigo e país. Termos freqüentemente utilizados para definição de consumo como leve, moderado e severo também apresentam diferentes definições (Kloner e Rezkalla, 2007). Muitos estudos optam pela quantificação do consumo de álcool em g (Shimazaki, Saito *et al.*, 2005; Okamoto, Tsuboi *et al.*, 2006) ao passo que outros utilizam a definição tradicional de drinque (Tezal, Grossi *et al.*, 2004; Kongstad, Hvidtfeldt *et al.*, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (Who, 2004) define bebedores moderados como homens que consomem menos do que 21 unidades de álcool por semana e mulheres que consomem menos de 14 unidades de álcool por semana. A unidade de álcool, no presente caso, refere-se a 10g de álcool puro o que representaria não mais do que 2 latas de cerveja por dia em relação aos homens. Szabo *et al.* (2009) define o consumo moderado como sendo entre 1 e 2 drinques por dia considerando cada unidade contendo 15g de álcool puro. Diaz *et al.* (2002) ,em um recente artigo de revisão, propuseram uma nova definição sobre consumo moderado de álcool

estabelecendo um padrão de consumo abaixo dos limites preconizados pela OMS: de 20 a 24g de álcool puro por dia para homens e 10 a 12g por dia para mulheres.

Segundo a Associação Dietética Americana e o Instituto Nacional de Abuso de Álcool e Alcoolismo dos Estados Unidos, dose padrão (drinque) refere-se a uma dose de 44ml de um licor com teor alcoólico de 40%, a uma lata de cerveja (355ml) com teor alcoólico de 5% ou a uma taça de vinho (148ml) com teor alcoólico de 12%.

Além disso, define-se como consumo crônico de álcool a ingestão de mais de 3-5 drinques por dia para homens e mais que 2 drinques por dia para mulheres (Szabo e Mandrekar, 2009). O termo em inglês “Binge Drinking” também é freqüentemente utilizado na literatura como a ingestão de mais de 4-5 drinques para homens e mais de 3 drinques para mulheres em um momento específico elevando a concentração de álcool no sangue e gerando efeitos nocivos à saúde geral (Kloner e Rezkalla, 2007; Szabo e Mandrekar, 2009).

As discrepâncias entre conceitos e definições atualmente existentes na literatura prejudicam o estudo dos efeitos do álcool na saúde geral pela impossibilidade de comparação entre os mesmos. Tal fato pode explicar os recentes achados dos estudos que divergem sobre a influência do álcool nas doenças periodontais destrutivas.

3. Mecanismos de ação do álcool na modulação do sistema imune

A literatura tem evidenciado que o álcool possui uma função modulatória do sistema imune e que essas alterações podem ser distintas dependendo da dose de álcool consumida (Pavia, La Mothe *et al.*, 2004), ao passo que a administração branda de álcool ocasiona um aumento na ativação de células do sistema inflamatório, o consumo crônico causa uma redução nas mesmas (Szabo e Mandrekar, 2009).

O impacto do consumo excessivo de álcool no sistema imunológico e o aumento da predisposição a ocorrência de diversas infecções tem sido apontado na literatura (Szabo, 1999; Salerno, Waltenbaugh *et al.*, 2001; Duryee, Klassen *et al.*, 2007). O consumo excessivo desta substância está associado a reduzida resposta do hospedeiro em relação a suas defesas antimicrobianas, imunidade antiviral e reparo a traumas ou injúrias (Szabo, 1999; Pavia, La Mothe *et al.*, 2004). Isso, em parte, explicaria a redução da resposta imune em pacientes abusadores de bebidas alcoólicas seria a atrofia medular e deficiências nutricionais geradas por esse comportamento (Diaz, Montero *et al.*, 2002).

O abuso de álcool gera deficiências tanto no sistema de defesa imune inato (considerado como a primeira linha de defesa aos patógenos invasores) quanto no sistema imune adaptativo (principalmente linfócitos T). Mandrekar *et al.* (2004) constataram que a ingestão aguda de álcool em apenas uma determinada ocasião foi capaz de ocasionar um decréscimo no número de monócitos apresentadores de antígenos e uma redução da capacidade dos mesmos de induzir ativação de linfócitos-T. A inibição de células apresentadoras de antígeno do sistema de defesa inato, monócitos e macrófagos, pelo álcool acarreta em um decréscimo na proliferação de células T (Szabo e Mandrekar, 2009). Da mesma maneira, altas doses de álcool demonstraram um efeito inibitório na função de células natural killer responsáveis pela eliminação de células tumorais e/ou infectadas por patógenos (Gamble, Mason *et al.*, 2006; Romeo, Warnberg, Nova, Diaz, Gomez-Martinez *et al.*, 2007).

Um estudo realizado em ratos verificou um atraso na resposta hipersensitiva após administrações crônicas de álcool (Jayasinghe, Gianutsos *et al.*, 1992). Em humanos, verificou-se que após 5 a 7 dias de consumo crônico de bebidas alcoólicas, alterações nas funções de macrófagos e monócitos já podem ser observadas (Szabo, 1999).

Apesar dos mecanismos ainda não estarem esclarecidos na literatura, diversos autores apontam para um efeito positivo no sistema imune após a ingestão de baixas doses de álcool ou através de um consumo moderado (Diaz, Montero *et al.*,

2002; Pavia, La Mothe *et al.*, 2004; Romeo, Warnberg, Nova, Diaz, Gomez-Martinez *et al.*, 2007).

4. Mecanismos de modulação do álcool na resposta inflamatória

Assim como no sistema imunológico, a ação do álcool sobre a resposta inflamatória do hospedeiro apresenta resultados opostos (Szabo, Mandrekar *et al.*, 1996). Consumo de baixas doses de álcool demonstrou uma inibição na resposta inflamatória sistêmica ao passo que o uso crônico desta substância levou a um aumento na resposta inflamatória celular (Szabo, Mandrekar *et al.*, 1996; Imhof, Woodward *et al.*, 2004; Romeo, Warnberg, Nova, Diaz, Gonzalez-Gross *et al.*, 2007). A expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 esteve reduzida em pessoas que faziam um consumo moderado de bebidas alcoólicas a apresentaram-se elevadas em pessoas que relataram consumo crônico de bebidas (Gamble, Mason *et al.*, 2006). Foi verificado que monócitos de pacientes com doença hepática apresentavam produção aumentada de TNF- α (McClain, Barve *et al.*, 1999).

Inversamente, o uso moderado de álcool demonstrou inibição de mediadores inflamatórios, o que explica os efeitos benéficos deste na prevenção da aterosclerose, onde a ativação da via inflamatória parece ter papel fundamental na progressão da doença (Szabo e Mandrekar, 2009). Os efeitos antiinflamatórios do álcool puderam ser observados com doses entre 0.8-6g/kg (Hijmering, De Lange *et al.*, 2007). Em um levantamento epidemiológico realizado na Europa Ocidental (Imhof, Woodward *et al.*, 2004), o consumo moderado de vinho ou cerveja esteve associado a menores níveis de marcadores inflamatórios sistêmicos. Reduções nos níveis de Proteína C-reativa, importante marcador inflamatório sistêmico na ocorrência de infartos, apresentaram-se reduzidos em bebedores moderados quando comparados a não bebedores ou a pessoas com um nível de consumo excessivo de álcool (Imhof, Froehlich *et al.*, 2001; Albert, Glynn *et al.*, 2003). A redução nos níveis da Proteína C-reativa, segundo Estruch *et al.* (2004), ocorre com um consumo de 30g de álcool por dia.

5. Riscos do consumo de álcool para a saúde geral

O abuso crônico de álcool (120 a 150g de álcool por dia ou consumo acima de 8 drinques) tem sido associado com imunossupressão e aumento da morbidade e mortalidade (Nelson e Kolls, 2002). A imunossupressão gerada pelo consumo abusivo de álcool é apontada como fator principal da maior ocorrência de doenças infecciosas e a maior propensão de alcoólatras a infecções bacterianas e virais (Ruiz, Ewig *et al.*, 1999; Romeo, Warnberg, Nova, Diaz, Gomez-Martinez *et al.*, 2007).

Apesar disto, as condições mais freqüentes em abusadores de álcool são fígado gorduroso, neuropsicológicas, sangramento gastrointestinal, neuropatia, deficiências nutricionais e miopatia do esqueleto (Diaz, Montero *et al.*, 2002). Já hepatites e pancreatites são doenças inflamatórias que constantemente afetam os alcoólatras (Jerrells, Vidlak *et al.*, 2007). Tais condições são mediadas principalmente pela função imune.

O álcool, um reconhecido fator carcinogênico, é o principal responsável pela ocorrência de câncer de esôfago, faringe e fígado (Rehm, Room *et al.*, 2003). Pressão alta, infarto e doenças respiratórias também têm sido fortemente associadas ao consumo abusivo de bebidas alcoólicas (Hanna, Chou *et al.*, 1997).

6. Benefícios do consumo moderado de álcool

Uma recente revisão acerca da relação do consumo de bebidas alcoólicas com determinadas doenças aponta para um efeito benéfico do consumo moderado apenas em relação às doenças coronarianas, infarto e poucas evidências em relação à prevenção do diabetes (Rehm, Room *et al.*, 2003).

Os benefícios do consumo moderado de álcool têm sido observados principalmente no que diz respeito à ocorrência de doenças cardiovasculares, onde uma curva de risco na forma de U ou J foi observada. Esta curva evidencia que pessoas que consomem bebidas alcoólicas de maneira moderada estão em menor

risco de desenvolverem doenças cardiovasculares do que pessoas que não bebem ou que bebem em demasia (Diaz, Montero *et al.*, 2002). Os benefícios do consumo moderado de álcool têm sido atribuídos à redução em marcadores inflamatórios da aterosclerose (Imhof, Froehlich *et al.*, 2001) e à melhora no perfil lipídico de pacientes que bebem moderadamente, o que parece ser importante em pessoas com perfil de alto risco para a ocorrência de mortalidade por eventos cardiovasculares (Gigleux, Gagnon *et al.*, 2006).

Gaziano *et al.* (1993), em uma investigação com 680 pacientes, observaram um aumento significativo nos níveis de HDL em pacientes que relataram um consumo moderado de álcool (1 a 3 drinques por dia).

Uma recente metanálise (Corrao, Rubbiati *et al.*, 2000) com 51 estudos, sendo 43 prospectivos, estimou uma redução de até 20% no risco de ocorrência de doenças cardiovasculares para uma ingestão diária de até 20g de álcool puro. A redução no risco foi observada para um consumo de até 72g de álcool puro por dia. Em relação à morte súbita devido a problemas cardíacos, um estudo prospectivo (Albert, Manson *et al.*, 1999) com 21.537 homens verificou que aqueles que consumiam 2 a 4 drinques por semana tiveram um risco reduzido de morte (RR 0.40; 95% CI, 0.22-0.75) e os que consumiam 5 a 6 drinques por semana tiveram um risco menor ainda (RR 0.21; 95% CI, 0.08-0.56). Em outra metanálise (Di Castelnuovo, Costanzo *et al.*, 2006) que verificou uma curva em formato de J na relação entre o consumo de álcool com mortalidade total, a menor taxa de mortalidade foi observada com o consumo diário de 6g de álcool puro (RR 0.81; 95% CI, 0.80-0.83). Risco reduzido de morte foi observado com um consumo de até 4 drinques por dia em homens. Em mulheres, o consumo de até 2 doses foi considerado protetor para risco de morte.

Com relação à melhora no sistema imune, Cohen *et al.* verificaram um risco reduzido à ocorrência de infecções respiratórias em pacientes que consumiam 3 a 4 drinques por semana (Cohen, Tyrrell *et al.*, 1993).

7. Plausibilidade biológica para a relação do consumo de álcool com as doenças periodontais destrutivas

Tendo em vista os recentes achados sobre a dualidade do efeito do álcool sobre o sistema imunológico (Diaz, Montero *et al.*, 2002) e mediadores inflamatórios sistêmicos (Szabo, Mandrekar *et al.*, 1996), é possível que as doenças periodontais destrutivas possam ter uma modulação semelhante tendo em vista sua natureza infecto-inflamatória. Estudos recentes que avaliaram o efeito do álcool sobre as periodontites observaram a mesma relação protetora para consumo de álcool leve a moderado ainda que muitos tenham verificado esta relação apenas em análises não ajustadas (Tezal, Grossi *et al.*, 2001; Nishida, Tanaka *et al.*, 2004; Shimazaki, Saito *et al.*, 2005; Kongstad, Hvidtfeldt *et al.*, 2008).

Portanto, é possível que o consumo moderado de álcool, com um impacto positivo no sistema de defesa e uma redução nos marcadores inflamatórios sistêmicos, seja responsável por uma menor ocorrência ou uma menor progressão das doenças periodontais destrutivas. Por outro lado, a ingestão de altas doses de bebidas alcoólicas poderia causar uma redução na imunocompetência do hospedeiro e um aumento na secreção de mediadores inflamatórios sistêmicos, incorrendo em maior destruição dos tecidos de suporte do dente e progressão da periodontite.

8. Associação do álcool com as doenças periodontais em humanos

Os estudos realizados até o presente momento, a maioria de natureza transversal, apontaram para resultados diferentes sobre a influência do álcool nas periodontites. Tais divergências podem estar ocorrendo pela ausência de uma definição de parâmetros precisos sobre padrões e quantidades referentes a uma ingestão moderada de álcool (Kloner e Rezkalla, 2007) ou pela ação bifásica do álcool sobre o sistema imune e sobre marcadores inflamatórios sistêmicos (Romeo, Warnberg, Nova, Diaz, Gomez-Martinez *et al.*, 2007; Szabo e Mandrekar, 2009). O sumário dos estudos que buscaram esta relação está apresentado na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Estudos avaliando a relação do consumo de bebidas alcoólicas com as doenças periodontais.

Autor, Ano, Tipo de Estudo, País	Amostra	Aferição de álcool	Exame periodontal	Resultados	Observações
Amaral <i>et al.</i> (2008) Transversal Brasil	N =98 homens (49 alcoólatras e 49 não-alcoólatras)	Questionários (AUDIT + CAGE) SIM/NÃO	Completo (6 sítios)	Pacientes alcoólatras apresentaram maior média de NIC e PS do que não-alcoólatras	Critério para consumo de álcool dicotômico
Kongstad <i>et al.</i> (2008) Transversal Dinamarca	N =1521 adultos 817 mulheres 704 homens	Questionário de frequência de consumo (carta) Drinques por semana: H: <1;1-6;7-14;>14 M: <1;1-5;6-10;>10	Completo (6 sítios)	Relação inversa entre consumo total de álcool e NIC em homens. OR 0.51 e 0.31 para ingestão de 21-34 drinques e >34 drinques respectivamente	Uma curva J foi verificada para mulheres na relação entre consumo de álcool e NIC antes do ajuste para variáveis confundentes
Jansson <i>et al.</i> (2008) Longitudinal (20a.) Suécia	N =513	Questionário de frequência de consumo cL de álcool puro por dia: 0-1;1.01-2;2.01-3;3.01-4;4.01-5;>5	Radiografias	Perda óssea não esteve associada ao consumo de álcool	Não realizou exame periodontal

Okamoto <i>et al.</i> (2006) Longitudinal (4a.) Japão	N =1332 homens	Questionário de frequência Não-consumidores <20g/dia >20g/dia	Exame parcial (CPI)	Nenhuma relação encontrada entre dose de consumo de álcool e doença periodontal	Uso de exame periodontal parcial (CPI) para diagnóstico periodontal
Bouchard <i>et al.</i> (2006) Transversal França	N =2132 1044 homens 1088 mulheres	Questionário Não bebedores Bebedores ocasionais Bebedores regulares	Exame completo (4 sitios)	Não bebedores (OR 1.6) e bebedores regulares (OR 1.4) apresentaram maior risco a PI severa (>5mm) do que bebedores ocasionais	Não utiliza tipo de bebida na análise
Shimazaki <i>et al.</i> (2005) Transversal Japão	N =961 378 homens 583 mulheres	Questionário de frequência (g álcool/dia) Não bebedores (0) Leves (0.1-14.9) Moderados (15-29.9) Severos (>30)	Exame parcial	Bebedores moderados e severos apresentaram maior risco de apresentarem mais de 35% dos dentes com PS>4mm (OR 2.7 e 2.5 respectivamente). Não houve associação com o NIC	Bebedores leves apresentaram menor risco (NS) para ter >35% de dentes com PS>4mm
Tezal <i>et al.</i> (2004) Transversal EUA	N =13198 6007 homens 6716 mulheres	Questionário (drinques/semana) Categorias: 5;10;15;20 drinques/semana	Exame parcial (NHANES III)	Associação linear direta entre frequência de consumo de álcool e NIC (OR variando de 1.22 a 1.67)	Relação dose resposta

Nishida <i>et al.</i> (2004) Transversal Japão	N =372 290 homens 82 mulheres	Questionário <33g/dia >33g/dia	Exame completo	Associação entre consumo excessivo de álcool de doença periodontal (PS) OR 1.98	Bebedores leves apresentaram melhor saúde periodontal do que não bebedores
Pitiphat <i>et al.</i> (2003) Longitudinal (4a) EUA	N =39461 homens	Questionário de frequência (g/dia) 0; 0.1-4.9;5-14.9;15- 29.9;>30	Periodontite auto- reportada	Associação positiva entre consumo de álcool e doença periodontal em todas as categorias de consumo com RR variando de 1.24 a 1.27	Análise estratificada para o tipo de bebida não apresentou diferenças estatísticas.
Tezal <i>et al.</i> (2001) Transversal EUA	N =1371 661 homens 710 mulheres	Questionário (drinques/semana) <5 e ≥5 <10 e ≥10	Exame completo (6 sitios)	SS : consumo de mais de 5 drinques representou maior risco à doença (OR 1.65) NIC : consumo maior que 5 drinques (OR 1.36) e maior que 10 drinques (OR 1.44)	Sujeitos no grupo de bebedores leves apresentaram maior grau de saúde periodontal em relação ao NIC
Shizukuishi <i>et al.</i> (1998) Transversal Japão	N =310 252 homens 58 mulheres	Questionário (Quantidade em gramas de álcool consumida por dia)	Exame parcial (CPI)	Consumo acima de 60g por dia esteve associado a pior saúde periodontal (OR 3.2)	Uso de exame periodontal parcial (CPI) para diagnóstico periodontal

Sakki <i>et al.</i> (1995) Transversal Finlândia	N =527	Questionário (drinques/2 semanas) Abstêmios <7 >7	Exame parcial em 4 sítios por dente (somente a PS foi avaliada – análise por percentual de sítios com PS>3mm)	Pessoas que bebiam até 7 drinques em 2 semanas apresentaram um OR 1.76 para ocorrência de bolsas >3mm. Pessoas que bebiam mais do que 7 drinques em 2 semanas apresentaram um OR 2.52 para ocorrência de bolsas >3mm.	Não verificaram NIC
---	--------	---	--	---	------------------------

Legenda :

H : Homens

M: Mulheres

OR: Odds Ratio

CPI: Community Periodontal Index

SS: Sangramento à sondagem

NIC: Nível de inserção clínica

9. Associação do álcool com as doenças periodontais : estudos em modelo animal

Modelos em animal têm sido recentemente utilizados para o estabelecimento da relação do álcool com as doenças periodontais destrutivas. Apenas quatro estudos, todos realizados em ratos Wistar, investigaram o efeito do álcool sobre a perda óssea alveolar induzida por meio de ligaduras. Em um destes estudos (Irie, Tomofuji *et al.*, 2008), a administração de álcool ocorreu através de uma dieta exclusivamente líquida, onde a quantidade de etanol representava 36% do valor calórico total da solução. Nos demais estudos (Souza, Ricardo *et al.*, 2006; De Souza e Rocha, 2009; Souza, Ricardo *et al.*, 2009), foi realizada a administração do álcool como parte da dieta líquida em concentrações que variaram de 10% a 30% associada com ração para ratos. Em todas as concentrações administradas nos experimentos, observou-se uma maior perda óssea para os ratos do grupo teste comparados aos seus respectivos controles. A concentração do álcool presente na dieta tem sido utilizada como um meio de comparação do possível efeito de dose resposta na perda óssea alveolar em ratos Wistar. No entanto, dois estudos (Irie, Tomofuji *et al.*, 2008; De Souza e Rocha, 2009) utilizaram uma metodologia distinta, definindo a quantidade de álcool através do seu percentual calórico em relação ao total de calorias da solução administrada.

Souza *et al.* (2006) utilizaram 63 ratos machos divididos em sete grupos. Os ratos receberam dieta líquida contendo etanol (Lieber e Decarli, 1974) em concentrações de 10%, 20% e 30% de acordo com o grupo a que pertenciam. Grupos controles foram estabelecidos através de uma dieta com a mesma quantidade de calorias, mas sem a presença de etanol, fornecidas aos ratos do grupo teste nas respectivas concentrações. Foi estabelecido um grupo controle em que foi fornecido apenas ração e água. As mensurações de perda óssea foram feitas através de medidas lineares em radiografias digitais tomadas dos espécimes. Após 8 semanas de estudo e de indução de doença periodontal através de ligaduras, os autores observaram que os ratos que haviam recebido uma dieta líquida contendo etanol apresentaram uma maior perda óssea, sendo esta

estatisticamente significativa, em relação aos seus respectivos grupos controles. Entretanto, apesar de diversas concentrações de álcool terem sido administradas, não foi observada uma relação de dose-resposta.

Irie *et al.* (2008) realizaram uma investigação em 26 ratos Wistar machos divididos em 4 grupos. Para 2 grupos, foi administrada uma dieta líquida contendo etanol (Lieber e Decarli, 1974) numa concentração de 36% do valor calórico total da solução, os dois outros grupos receberam uma dieta isocalórica sem a presença de etanol. A doença periodontal foi induzida em um grupo por meio de ligaduras na quarta semana de estudo em um grupo que recebia etanol como parte da dieta e em um dos grupos controle. Ao final da oitava semana do estudo os ratos foram mortos. A análise histométrica da junção amelocementária à crista óssea verificou uma maior perda óssea para os grupos teste (etanol) em relação aos respectivos controles. Contudo, esta maior perda óssea foi somente estatisticamente significativa quando comparados os dentes que não haviam recebido ligaduras.

Souza *et al.* (2009) realizaram um novo estudo em ratos Wistar fêmeas onde foram avaliados os efeitos de concentrações de álcool de 10% e 20% administradas sob forma de dieta líquida associada a ração para ratos. Foram utilizadas 36 ratas divididas em três grupos que recebiam diariamente dieta líquida contendo água (grupo controle), álcool 10% ou álcool em uma concentração de 20%. A indução de doença periodontal por meio de ligaduras foi realizada apenas na quarta semana de andamento do experimento em apenas metade dos ratos de cada grupo, permanecendo os demais como controles intra-grupo. Ao final da oitava semana, os ratos foram mortos e a análise morfométrica realizada através de mensurações lineares. Os resultados mostraram que, nos ratos em que não foi realizada a colocação de ligaduras para indução de doença periodontal, não houve diferença entre os grupos teste e o grupo controle. Entretanto, quando a doença periodontal foi induzida através de ligaduras, para os ratos que receberam uma dieta contendo etanol 20%, foi observada uma maior perda óssea, sendo esta estatisticamente significativa, em relação aos ratos que receberam etanol 10% e ratos do grupo controle. Entretanto, neste estudo foi observada uma relação de dose resposta entre consumo de álcool e perda óssea já que os ratos que receberam

dieta contendo etanol 10% apresentaram maior perda óssea, não estatisticamente significativa, em relação ao grupo controle.

No mais recente estudo, realizado por Souza *et al.* (2009), 36 ratos Wistar machos foram divididos igualmente em 4 grupos. Um grupo teste recebeu uma dieta líquida contendo etanol representando 22% do valor calórico total da solução – o que representou uma concentração de álcool de aproximadamente 10%. Um respectivo grupo controle recebeu uma dieta com o valor calórico do etanol trocado por carboidratos. Um segundo grupo teste recebeu uma dieta em que o álcool representava 36% do valor calórico total da solução – o que representou uma concentração de álcool de aproximadamente 20%. De maneira semelhante, um respectivo grupo controle recebeu uma dieta com carboidratos substituindo as calorias do álcool. A indução de doença periodontal foi realizada por meio de ligaduras sendo que os dentes contra-laterais permaneceram como controles intra-grupo. Ao final da oitava semana os ratos foram mortos e a análise morfométrica linear realizada. Nos dentes que não receberam ligadura, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, em relação à perda óssea, dos grupos teste em comparação com seus respectivos controles. Entretanto, quando comparados os dentes que receberam ligaduras, o grupo teste que recebeu etanol em menores calorias (representando 22% do valor calórico total da solução) apresentou uma maior perda óssea, sendo esta estatisticamente significativa, em relação ao seu respectivo controle. Surpreendentemente, tal fato não foi observado quando comparados o grupo teste que recebeu álcool representando 36% do valor calórico total da solução em comparação ao seu respectivo controle.

Até o presente momento, não existem na literatura estudos em modelo animal que procuraram avaliar o efeito de concentrações mais brandas de álcool na perda óssea alveolar.

9.1 Métodos de administração de álcool em ratos

As características de dependência e tolerância ao álcool em ratos são similares às aquelas observadas em humanos tornando-os um modelo interessante para estudos com tal finalidade (Tabakoff e Hoffman, 2000). Diversas formas de administração do álcool têm sido propostas na literatura sendo que cada uma delas tem interferências sistêmicas distintas. Os dois primeiros métodos aqui descritos foram concebidos como modelos para desenvolvimento de doenças alcoólicas no fígado.

Lieber *et al.* (1974) propuseram um método de alimentação com a presença de álcool misturado a uma dieta líquida de altas calorias e uma dieta controle com a substituição das calorias derivadas do álcool por carboidratos (maltodextrina). Em ambas as dietas, os autores observaram patologias geradas no fígado (esteatose e inflamação). Este modelo tem sido utilizado nos estudos (Souza, Ricardo *et al.*, 2006; Irie, Tomofuji *et al.*, 2008) da relação do álcool com as doenças periodontais por ser capaz de evitar deficiências nutricionais decorrentes da administração de elevadas doses de álcool.

O modelo intragástrico de administração de álcool proposto por French *et al.* (1986) é capaz de gerar maiores danos ao fígado através de uma administração contínua de álcool associado a uma dieta de baixas calorias. Neste modelo, o aumento do dano gerado no fígado (esteatose hepática e necroinflamação) é possível através do aumento da quantidade de calorias da dieta.

Por fim, o modelo proposto por Coleman *et al.* (2008) é capaz de mimetizar o consumo humano crônico de álcool sem a ocorrência de doenças no fígado. Este método, mais prático que os anteriormente descritos, envolve a administração de uma dieta composta pela ração para ratos e a presença do álcool diluído em água potável.

9.2 Métodos de avaliação da perda óssea alveolar em modelo animal

O modelo de doença periodontal induzida em ratos tem sido usado para a determinação de possíveis fatores de risco que interfiram no curso da doença (Susin e Rosing, 2003; Cavagni, Soletti *et al.*, 2005; Souza, Ricardo *et al.*, 2006; Verzeletti, Gaio *et al.*, 2007; Soletti, Gaio *et al.*, 2009). As questões éticas e as dificuldades em relação a natureza multifatorial das doenças periodontais em humanos fazem com que o modelo de doença em ratos torne-se atrativo para o estudo dos efeitos do álcool nas periodontites (Tabakoff e Hoffman, 2000). Os meios de aferição morfométrico e histométrico têm sido usados para quantificar a perda óssea alveolar em ratos Wistar (Dumitrescu, Abd-El-Aleem *et al.*, 2004; Kuhr, Popa-Wagner *et al.*, 2004; Cavagni, Soletti *et al.*, 2005).

O método morfométrico tem sido aferido a partir de fotografias digitais tomadas dos espécimes (Cavagni, Soletti *et al.*, 2005) e radiografias digitais (Kesavalu, Sathishkumar *et al.*, 2007). Recentemente, o método de tomografia computadorizada tem sido empregado para a mesma finalidade (Park, Abramson *et al.*, 2007). Além disso, dentro do mesmo método de avaliação, os estudos têm empregado medidas lineares da junção amelocementária à crista óssea ou da área total de perda óssea alveolar. Kuhr *et al.* (2004) compararam os métodos morfométrico de medidas lineares e de área total de perda óssea alveolar em ratos Wistar durante um período de 15, 30 e 60 dias. Os autores concluíram que, num período inferior a 15 dias, onde as discrepâncias na perda óssea alveolar entre os grupos são menores, ambos os métodos de avaliação são eficazes. Contudo, num período de 60 dias, quando as diferenças entre os grupos foram maiores, o método de mensuração de área de perda óssea alveolar foi mais fidedigno não apresentando diferenças estatísticas entre os grupos de comparação ao passo que o método linear detectou diferenças estatísticas entre os grupos.

Em relação às diferentes metodologias empregadas, alguns autores (Kuhr, Popa-Wagner *et al.*, 2004; Fernandes, Gaio *et al.*, 2007; Li e Amar, 2007; Fine, Schreiner *et al.*, 2009) têm realizado análises comparativas entre os métodos existentes (morfométrico, histométrico e tomográfico) e não têm encontrado

diferenças estatisticamente significantes entre os métodos de aferição de perda óssea. Contudo, a diversidade nos métodos de aferição de perda óssea atualmente empregados gera um viés ao passo que não permite uma comparação direta entre estudos com o mesmo propósito investigativo.

10. Objetivos

A presente dissertação, através de seus dois manuscritos intitulados “Low-dose alcohol intake may inhibit alveolar bone loss in Wistar rats” e “Comparison of two methods for alveolar bone loss measurement in an experimental periodontal disease model in rats” tem como objetivos:

-Avaliar o efeito do etanol 5% na perda óssea alveolar em ratos Wistar;

-Realizar uma comparação entre dois métodos de mensuração morfométrica da perda óssea alveolar por meio de fotografias de maxillas processadas de ratos Wistar e propor uma fórmula para estimativa de perda óssea de área através de medidas lineares unicamente.

MANUSCRITO I

Low-dose alcohol intake may inhibit alveolar bone loss in Wistar rats**Diego Nique Liberman¹****Roberta Manjabosco Pilau²****Eduardo José Gaio¹****Lorena Floriani Orlandini³****Cassiano Kuchenbecker Rösing¹**

¹ Post-graduate Program in Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, ² Graduate Student in Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, ³ Post-graduate Program in Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, ⁴ Department of Conservative Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Corresponding author:

Cassiano Kuchenbecker Rösing

Rua Dr. Valle, 433/701 - 90560-010 – Porto Alegre – RS – Brasil.

Tel/Fax: +55 51 3338 4221, ckrosing@hotmail.com

ABSTRACT

Recent studies that associated alcohol consumption and periodontal disease, both in humans and animals, have led to divergent results. Since medical literature reported some benefits of moderate alcohol consumption in immune system and on the reduction of inflammatory systemic markers and no studies in animals have dealt with this issue, the aim of the present study was to evaluate the influence of ethanol in low concentration (5%) in periodontal disease induced in Wistar rats. Thirty rats were equally randomized into Test and Control groups. Test group received a liquid diet containing ethanol 5% (vol./vol.) and rat chow. Control group received only tap water as the liquid diet and the same rat chow. In both groups, diet was delivered ad libitum. Periodontitis was induced prior to the beginning of the study by means of ligatures placed around second upper right molar. The contra-lateral teeth remained as intra-group control. At the end of the ninety week, the animals were killed and morphometric analysis of alveolar bone loss was performed by a blind examiner. Animals receiving ethanol 5% presented less (statistical significant) alveolar bone loss in unligated teeth when compared to Control group (0.32 ± 0.07 and 0.37 ± 0.07 respectively; $p=0.04$). In ligated teeth, despite the fact that rats receiving ethanol 5% presented less alveolar bone loss, no statistical difference was observed between Test and Control groups (0.78 ± 0.14 and 0.84 ± 0.18 respectively; $p=0.14$). The results of this study lead to the conclusion that alcohol in low concentrations may inhibit alveolar bone loss in Wistar rats.

Keywords : alveolar bone loss, periodontitis, alcohol drinking, animal model

INTRODUCTION

Recently, the association between alcohol consumption and periodontal breakdown has been suggested by cross-sectional [1-11] and longitudinal investigations [4, 12, 13]. The majority of studies in humans have associated alcohol consumption with worse periodontal parameters like deeper probing depths [1, 2, 6-9], higher clinical attachment loss [1, 2, 10, 11], increased bleeding on probing [10] and self-reported periodontitis [13]. However, two longitudinal studies [4, 12] did not demonstrate any association and one study [5] observed an inverse relationship between total alcohol consumption and clinical attachment level in humans. Interestingly, Bouchard *et al.* [3] concluded that non-drinkers and regular drinkers were at a higher risk for severe attachment loss than occasional drinkers (OR1.6; CI 1.2 – 2.1 and OR1.4; CI 1.1 – 1.8, respectively).

To the best of our knowledge, four investigations in animals have evaluated the relationship between ethanol consumption and periodontal disease. Methodologies among alcohol administration vary between them as long as two studies [14, 15] utilized absolute concentration of ethanol in the liquid diet and two investigations [16, 17] refers concentrations of alcohol based in total caloric value of solution. Irie *et al.* [17] utilized 26 Wistar rats that were randomly divided into 4 groups. Two groups were fed with a liquid diet containing ethanol at a 36% of total caloric value, and 2 groups were fed by a pair-fed control diet. In one of each dietary group, alveolar bone loss was induced by ligature. The other group remained as control. Histological analysis revealed that the distance between the cemento-enamel junction to the alveolar bone crest and the distance between the cemento-enamel junction and the most apical portion of the junctional epithelium were greater in the Ethanol group than in the Control group. However, ethanol did not affect ligature-induced bone resorption or apical migration of the junctional epithelium. Souza *et al.* [15] utilized 63

Wistar rats divided into seven groups that were fed with alcohol containing liquid diet and rat chow. Absolute concentrations of alcohol were at 10%, 20% and 30% with respective dietary control groups. In this investigation, alcohol consumption was associated with higher statistically significant alveolar bone loss in groups that consumed ethanol as a part of dietary intake but no association between dose-response was observed. A similar study [14] was conducted in 36 adult female Wistar rats with absolute alcohol concentrations of 10% and 20% . Ligatures were placed after 4 weeks of study and remained until the eight week. Morphometric analysis revealed significant higher alveolar bone destruction in the rats receiving 20% ethanol in ligated teeth when compared to control group and rats that received 10% ethanol.No statistical difference was observed among three groups in unligated teeth and between rats receiving 10% ethanol and control group.In this investigation,administration of ethanol increased alveolar bone loss in a dose-dependent manner. The same authors [16] conducted another study in 36 male Wistar rats divided into four groups.Two groups received ethanol in a liquid diet representing 22% of total caloric value (low caloric value of ethanol) and 36% of total caloric value (high caloric value of ethanol) respectively. Two groups remained as dietary respective control groups.Morphometric analysis revealed a statistical greater alveolar bone loss in ligated teeth in rats receiving ethanol 22% of total caloric value and respective control group. No statistical differences was observed between rats receiving ethanol 36% of total caloric value and respective control group and in unligated teeth of all groups.

Medical reports about the relationship between alcohol intake and some systemic diseases have given particular attention on the U- or J-shaped curve which suggests that light to moderate drinking produces a protective effect improving immune system [18]. It has also been reported that moderate consumption of alcohol can reduce risk of hypertension [19, 20],

coronary heart disease [21] and levels of systemic inflammatory markers [22]. An *in vitro* study reported the benefit of moderate beer intake to its ability to interfere with pro-inflammatory cytokine cascades [23]. Moreover, Mandrekar *et al.* [24] have suggested that light drinking (2ml vodka/kg body weight) has dual anti-inflammatory effects that involve augmentation of IL-10 and attenuation of monocyte inflammatory responses.

Based on the contradiction of the results presented in the literature and different methodologies applied on these studies, the influence of alcohol in periodontal disease remains unclear. Our hypothesis is that light consumption of alcohol may be able to modulate periodontal host inflammatory response. The aim of the present study was to evaluate the effect of 5% ethanol (absolute concentration) on alveolar bone loss in Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

Experimental Animals

Thirty male Wistar rats with age ranging between 45 and 60 days were used in the present study. The experimental period was 9 weeks. Five rats were housed in each cage at a temperature varying from 18°C to 20°C and a 12 hours light and dark cycle. The experimental protocol was approved by the Ethical Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Sample Size Calculations

Sample size estimates were calculated based on data of a previous study[17]. A difference in 0.2mm in alveolar bone loss was expected as significant in teeth with ligature. Considering alpha and a beta errors of 0.05 and 0.20 respectively, a minimum number of nine animals per group was considered necessary. For a beta error of 0.10, a minimum number of 14 animals per group were required.

Experimental Groups and Procedures

Animals were randomly assigned, stratified by weight, by means of draw, into two groups. The control group (n=15) was fed with a standard laboratory rat chow and tap water *ad libitum* for 9 weeks. The test group (n=15) received the same standard diet but the water was replaced with 5% ethyl alcohol (Vetec®, Rio de Janeiro, Brazil) *ad libitum* throughout the experiment.

Both in test and control animals, alveolar bone loss was induced prior to the beginning of the study by placement of cotton ligatures (Ethicon, Johnson & Johnson, São Paulo, Brazil) around the maxillary right second molars under intra-peritoneal anesthesia with solution of 5% ketamine (Cetamin®, Ritobifarma, São Paulo, Brazil) and 2% xilazine (Dopaser®, Calier, Barcelona, Spain). The contra-lateral tooth remained as intra-group control [25-27]. Animals were sacrificed 9 weeks after ligature placement by CO₂.

The liquid and solid intake consumption was monitored during the study. Body weight of the animals was measured weekly, as well as the presence of the ligatures, that were verified in the same period. No ligatures were lost.

Morphometrical Registration of Bone Destruction

Following sacrifice, the right and left segments of the maxillae were defleshed in sodium hypochlorite with 8.5% active chlorine (Mazzarollo, Gravataí, Brazil) for 5 hours. After rinsing, the specimens were stained during 1 minute in methylene blue 1% (Quinta Essência, Porto Alegre, Brazil) to delineate the cemento-enamel junction [28].

Standardized digital pictures were taken from the buccal and palatal aspects of each specimen using a Nikon D100 (Nikon®, Ayuthaia, Thailand) camera coupled in a tripod with medical lenses and minimal focal distance. Each specimen was placed with the occlusal surface parallel to the floor. Linear measurements were performed by means of an image analysis computer software (Image Tool 3.0, UTHSCSA, San Antonio, USA). Periodontal bone loss was defined as the distance between the cemento-enamel junction and the alveolar bone crest. Buccal and palatal measurements were made at five points and a mean of these values was considered as the bone loss.

The examiner was unaware of the group distribution as well as of the ligature presence or absence. Measurements were converted into millimeters, utilizing a precision ruler as reference in the picture.

Reproducibility

To perform periodontal bone loss measurements, the examiner was previously trained and calibrated. Double measurements of 20 specimens with one-week interval were made. Intra-class correlation coefficient was obtained between the 2 measurements and revealed a very high correlation (ICC=0.98).

Statistical Analysis

The rat was considered the unit of analysis in this study. Comparison of mean body weight and dietary intake between groups was performed by independent T-test. Mean values of alveolar bone loss were obtained for buccal and palatal aspects separately. The intergroup means comparisons were assessed by independent T-test. Intragroup means were compared by paired-sample T-test. The level of significance was set at 5%.

RESULTS

All animals completed the experimental protocol. The body weight throughout the experiment is shown in *Figure 1*. No statistically significant differences were observed in mean body weight between test and control groups throughout the study.

Mean solid consumption (rat/day) was 18,85g for test group and 21,82g for control group. Liquid ingestion (rat/day) for test (ethanol 5%) and control (tap water) groups was 30,7ml and 31,58ml respectively. No statistically significant differences were observed among groups in liquid and solid intake.

The main outcome of the study is given in **Table 1**. After 9 weeks, mean alveolar bone loss in teeth without ligature was of 0.32 ± 0.07 and 0.37 ± 0.07 mm for test and control groups respectively. The rats in Test group presented statistically significant lower mean alveolar bone loss than controls in teeth without ligature ($p=0.04$). When the analysis was made separating buccal and palatal aspects, rats in the test group presented less alveolar bone loss than controls in buccal area ($p=0.01$), however no statistically significant difference was observed palatally ($p=0.15$). In teeth with ligature, mean alveolar bone loss was of 0.78 ± 0.14 for test group and 0.84 ± 0.18 mm for control group. No statistically significant differences were observed among groups in teeth with ligature ($p=0.14$). The post-hoc analysis separating buccal and palatal aspects showed no statistically significant difference between test and control groups neither in buccal ($p=0.13$) nor in palatal areas ($p=0.47$).

DISCUSSION

The present study evaluated the effect of low concentration of ethanol (5%) on the pathogenesis of alveolar bone loss in an experimental periodontitis model in Wistar rats. Our results showed that rats drinking ethanol in low concentration presented less alveolar bone loss in teeth without ligature as compared to controls. In teeth with ligatures, despite the fact that Test group presented less alveolar bone loss than controls no statistically significant differences were observed between groups.

The study of pathogenesis of periodontal breakdown, in order to understand the possible biological mechanisms involved, requires animal studies. Wistar rats have been extensively used in these kind of studies and the placement of ligatures leads to breakdown, since bacteria adhere to it [29]. The present study used all possible mechanisms to avoid bias

(randomization, blindness, calibration), thus increasing the validity of the results. Also, male rats were chosen in order not to have major hormonal influence. Additionally, intragroup analysis revealed that ligature-induced periodontal bone loss is a suitable experimental model since teeth with ligature presented more alveolar bone loss than teeth without ligature (paired-sample T-test; $p < 0.01$).

The present study administered low concentrations of alcohol for the animals since no studies had tested the hypothesis of these concentrations influencing periodontal breakdown. Despite some studies have demonstrated alcohol concentrations in percentage of total caloric value of the solution, only concentrations of 10% to 30% have been previously tested. Higher concentration of alcohol demonstrated to increase progression of periodontal bone loss in animals [15, 17]. The results of our study demonstrated less bone loss in teeth without ligatures in the test group. Some cross-sectional studies in humans also observed a protective effect against clinical attachment loss in light to moderate alcohol drinkers compared to non-drinkers and heavy drinkers [3, 5, 10]. Despite the lack of consensus in defining the light or moderate consumption of alcohol which has led to difficulties in comparing results in previous studies, it seems that small amounts of alcohol consumption may exert a protective effect on alveolar bone loss. This condition may be influenced by several factors like patterns of drinking (chronic or acute), amount (moderate or excessive), the body organ or system and type of alcohol consumed and by age and gender [30].

There are some plausible pathways by which small amounts of alcohol may have influence on alveolar bone loss. Dental biofilm is recognized as the primary etiology in pathogenesis of periodontal disease, but tissue breakdown involves the inflammatory host response [31]. Moderate alcohol intake reduces monocyte production of circulating pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-6 [32] and was associated with lower levels

of C-reactive protein in a multi-center cross-sectional study [22]. In a recent review of the literature, Díaz et al. [18] assumed that moderate alcohol consumption seems to have a better impact on the immune system than excessive or absence of consumption. Despite of the anti-inflammatory effect of small amounts of alcohol intake and the benefits on host immune-competence, the eventual antimicrobial effect in dental plaque could explain the better periodontal status observed in light drinkers [5].

The characteristics of alcohol dependence and tolerance in mice and rats are similar to those exhibited by humans [33]. A previous studie [17] in Wistar rats utilized alcohol delivered in a liquid diet as the sole source of nutrition. This model was proposed by Lieber *et al.* [34] and can be useful when high concentrations of alcohol are being studied since lack of nutrients can be prevented. However, it can be considered that this method differs from the normal pattern of alcohol intake in humans since hepatic damage are commonly observed[33]. Most part of investigations delivered alcohol in a liquid diet associated with rat chow in a model proposed by Coleman et al. [35]. In the present study, as alcohol was delivered in low concentration, animals in the test group were fed with a standard laboratory chow and a 5% (vol./vol.) ethyl alcohol. There was no difference in patterns of diet consumption between test and control groups regarding mean body weight measurements. We can then assume that this method of diet delivery seems not to affect nutrition when low concentrations of alcohol are being studied.

One intriguing finding of our study is the fact that the difference was only observed in teeth without ligatures. Interestingly, a previous study [17] that administered ethanol 36% of total caloric value observed higher and statistical alveolar bone loss only in unligated teeth. It has been demonstrated that some degree of alveolar bone loss occurs throughout time even without the presence of a retentive area such as ligatures [29]. A possible explanation is that

the presence of the ligature represents an excessive challenge, masking subtle effects in host response. However, the interpretation of the findings should be made with caution. In one hand, we could interpret that in teeth with ligatures, there is no effect of low-dose alcohol consumption and in other, that this regime could protect spontaneous bone loss in Wistar rats. Additionally, other possible negative effects of alcohol consumption should not be disregarded. However, the present study focuses in the understanding of alveolar bone destruction. One should keep clear that in any matter alcohol consumption should be recommended for prevention of alveolar bone loss. However, human longitudinal studies are warranted to better elucidate the findings. Low-dose alcohol consumption has been recommended for other purposes [36, 37] and we could understand if these benefits would also apply for periodontal breakdown. The results of the present study, taking into consideration its methods and limitations, leads to the conclusion that low-dose alcohol intake may inhibit alveolar bone loss in Wistar rats.

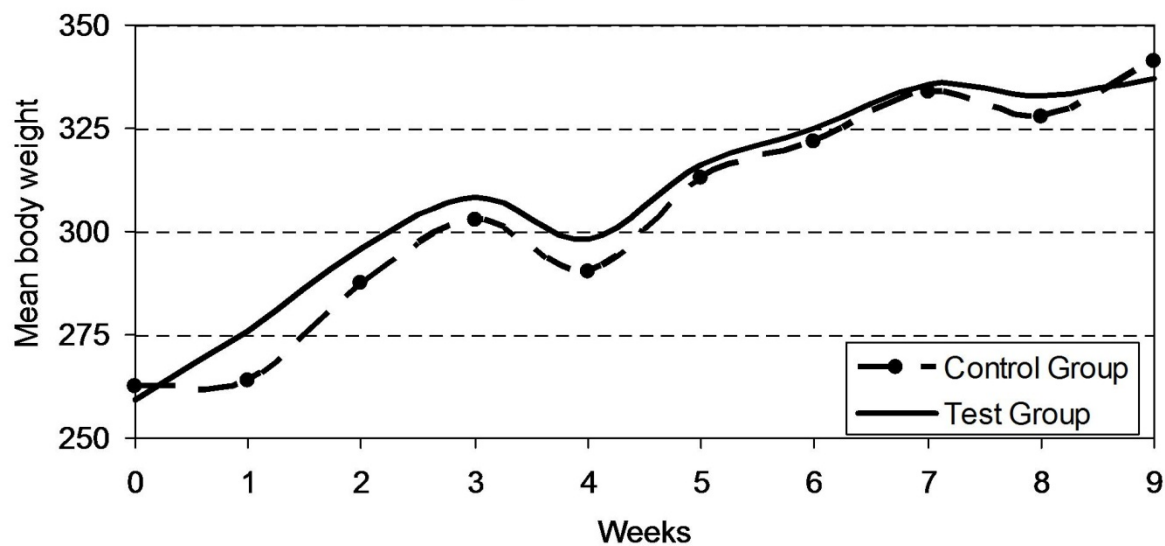
REFERENCES

- [1] Albandar JM. Periodontal diseases in North America. *Periodontol 2000* 2002;29:31-69.
- [2] Amaral Cda S, Luiz RR, Leao AT. The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *J Periodontol* 2008;79(6):993-8.
- [3] 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.
- [4] Jansson L. Association between alcohol consumption and dental health. *J Clin Periodontol* 2008;35(5):379-84.
- [5] Kongstad J, Hvidtfeldt UA, Gronbaek M, Jontell M, Stoltze K, Holmstrup P. Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Periodontol* 2008;35(12):1032-9.
- [6] Nishida N, Tanaka M, Hayashi N, Nagata H, Takeshita T, Nakayama K, et al. Association of ALDH(2) genotypes and alcohol consumption with periodontitis. *J Dent Res* 2004;83(2):161-5.
- [7] Sakki TK, Knuutila ML, Vimpari SS, Hartikainen MS. Association of lifestyle with periodontal health. *Community Dent Oral Epidemiol* 1995;23(3):155-8.
- [8] Shimazaki Y, Saito T, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Iida M, et al. Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama Study. *J Periodontol* 2005;76(9):1534-41.
- [9] Shizukuishi S, Hayashi N, Tamagawa H, Hanioka T, Maruyama S, Takeshita T, et al. Lifestyle and periodontal health status of Japanese factory workers. *Ann Periodontol* 1998;3(1):303-11.
- [10] Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol* 2001;72(2):183-9.
- [11] 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.
- [12] Okamoto Y, Tsuboi S, Suzuki S, Nakagaki H, Ogura Y, Maeda K, et al. Effects of smoking and drinking habits on the incidence of periodontal disease and tooth loss among Japanese males: a 4-yr longitudinal study. *J Periodontol Res* 2006;41(6):560-6.
- [13] Pitiphat W, Merchant AT, Rimm EB, Joshipura KJ. Alcohol consumption increases periodontitis risk. *J Dent Res* 2003;82(7):509-13.
- [14] Souza DM, Ricardo LH, Kantoski KZ, Rocha RF. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res* 2009;23(3):326-32.
- [15] Souza DM, Ricardo LH, Prado Mde A, Prado Fde A, 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.
- [16] de 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.
- [17] Irie K, Tomofuji T, Tamaki N, Sanbe T, Ekuni D, Azuma T, et al. Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. *J Dent Res* 2008;87(5):456-60.
- [18] Diaz LE, Montero A, Gonzalez-Gross M, Vallejo AI, Romeo J, Marcos A. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. *Eur J Clin Nutr* 2002;56 Suppl 3:S50-3.
- [19] Ascherio A, Rimm EB, Giovannucci EL, Colditz GA, Rosner B, Willett WC, et al. A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men. *Circulation* 1992;86(5):1475-84.
- [20] Ohmori S, Kiyohara Y, Kato I, Kubo M, Tanizaki Y, Iwamoto H, et al. Alcohol intake and future incidence of hypertension in a general Japanese population: the Hisayama study. *Alcohol Clin Exp Res* 2002;26(7):1010-6.
- [21] Di Castelnuovo A, Costanzo S, Bagnardi V, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Alcohol dosing and total mortality in men and women: an updated meta-analysis of 34 prospective studies. *Arch Intern Med* 2006;166(22):2437-45.

- [22] Imhof A, Woodward M, Doering A, Helbecque N, Loewel H, Amouyel P, et al. Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). *Eur Heart J* 2004;25(23):2092-100.
- [23] Winkler C, Wirleitner B, Schroecksnadel K, Schennach H, Fuchs D. Beer down-regulates activated peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Int Immunopharmacol* 2006;6(3):390-5.
- [24] Mandrekar P, Catalano D, White B, Szabo G. Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10. *Alcohol Clin Exp Res* 2006;30(1):135-9.
- [25] Galvao MP, Chapper A, Rosing CK, Ferreira MB, de Souza MA. Methodological considerations on descriptive studies of induced periodontal diseases in rats. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(1):56-62.
- [26] Simch RP, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of body weight in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand* 2008;66(3):130-4.
- [27] Soletti AC, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of neonatal clomipramine in the pathogenesis of ligature-induced periodontitis in Lewis rats. *Acta Odontol Scand* 2009;67(2):94-8.
- [28] Verzeletti GN, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of methotrexate on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *Acta Odontol Scand* 2007;65(6):348-51.
- [29] Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991;62(1):59-73.
- [30] Nelson S, Kolls JK. Alcohol, host defence and society. *Nat Rev Immunol* 2002;2(3):205-9.
- [31] Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res* 2003;82(2):82-90.
- [32] Szabo G, Mandrekar P, Girouard L, Catalano D. Regulation of human monocyte functions by acute ethanol treatment: decreased tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and elevated interleukin-10, and transforming growth factor-beta production. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;20(5):900-7.
- [33] Tabakoff B, Hoffman PL. Animal models in alcohol research. *Alcohol Res Health* 2000;24(2):77-84.
- [34] Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004;79(3):502-9.
- [35] Coleman RA, Young BM, Turner LE, Cook RT. A practical method of chronic ethanol administration in mice. *Methods Mol Biol* 2008;447:49-59.
- [36] Beulens JW, Sierksma A, van Tol A, Fournier N, van Gent T, Paul JL, et al. Moderate alcohol consumption increases cholesterol efflux mediated by ABCA1. *J Lipid Res* 2004;45(9):1716-23.
- [37] Romeo J, Warnberg J, Nova E, Diaz LE, Gomez-Martinez S, Marcos A. Moderate alcohol consumption and the immune system: a review. *Br J Nutr* 2007;98 Suppl 1:S111-5.

ANEXO I – MANUSCRITO I

Figure 1. Mean body weight between control and test groups throughout experiment.



ANEXO II – MANUSCRITO I

Table 1: Mean of alveolar bone loss (mm±SD) in sites with and without ligature according to the experimental group.

Group	Without Ligature			With Ligature		
	Buccal	Palatal	Teeth	Buccal	Palatal	Teeth
Control	0.32 ± 0.07	0.41 ± 0.06	0.37±0.07	0.90 ± 0.13	0.78 ± 0.21	0.84±0.18
Alcohol	0.26 ± 0.03	0.38 ± 0.07	0.32±0.07	0.82 ± 0.15	0.73 ± 0.14	0.78±0.14
p*	0.01**	0.15	0.04**	0.13	0.47	0.14

*Independent T-test

**Statistical difference between groups

MANUSCRITO II

PERIODONTICS

Comparison of two methods for alveolar bone loss measurement in an experimental periodontal disease model in rats.

Diego Nique Liberman¹

Roberta Manjabosco Pilau²

Lorena Floriani Orlandini³

Eduardo José Gaio¹

Cassiano Kuchenbecker Rosing¹

¹ Post-graduate Program in Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

² Undergraduate Student in Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Post-graduate Program in Veterinary Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ABSTRACT

There is a plenty of studies in the literature that evaluated some possible risk factors to periodontal diseases in animals. Most of them have focused only about biological aspects of disease occurrence and there is a current difficult to compare studies with the same thematic but different methodological aspects. The aim of the present study was to compare to different methods, linear and area, to evaluate alveolar bone loss morphometrically. Sixty hemi-maxillae defleshed and stained with methylene blue 1% to enhance cemento-enamel junction and alveolar bone crest were obtained from a previous study that induced periodontal disease by means of ligatures in two groups of fifteen Wistar rats during 9 weeks. Ligatures were placed around the right upper second molars and the contra-lateral teeth remained as intra-group control. Digital photographs were taken from the specimens and submitted to a single calibrated and blind examiner that performed the evaluation of alveolar bone loss by linear and area morphometric methods. Mean values of linear and area measurements were obtained from each side – buccal and palatal - of specimens. The degree of association between two methods performed to evaluate bone loss was obtained by Pearson's Correlation Test. An almost perfect association (0.98) were obtained between linear and area evaluations. A mathematic formula was created to estimate total area of alveolar bone loss only from linear mean measurements. Both methods were suitable in detecting bone level alterations.

Descriptors : alveolar bone loss, periodontitis, animal model, methods

INTRODUCTION

Periodontitis is defined as a chronic inflammatory disease affecting tooth supporting tissues which involves bacteria as the primary etiologic factor and culminating in the destruction of the dental attachment apparatus. Host defense, genetic and environmental factors are responsible for different periodontal conditions that can be observed in humans(1). Sometimes, identification of these modifying factors in humans is limited by confounding variables or ethical considerations (2). In rats, different models to induce periodontal disease have been proposed (3) and its' similarity with humans makes them an attractive model to study the pathogenesis of periodontitis(4).

Regarding methodological issues in the study of induced periodontal disease in rats, comparisons between investigations turns up to be almost impossible since different methods for periodontal disease induction, evaluation of alveolar bone loss and duration of studies have been applied. Recent studies have induced periodontal disease in rats by means of ligatures(4-8), LPS injection(9) and infection with periodontopathogenic bacteria(10, 11). Considering the experimental period, Kuhr *et al.* (12) have concluded that bone loss after placement of ligatures occurs mainly in the first 15 days and recommends this model with short observation periods. Susin & Rosing (8) observed no differences between analyses performed after 29, 43 or 57 days. Thus, they have suggested that periods shorter than 29 days in induced-periodontal disease observations should be considered. Otherwise, regarding particularly studies involving the influence of alcohol on bone loss, periods shorter than eight weeks are not recommended since a previous study observed a positive effect of ethanol on bone metabolism only after this period of time (13).

Different methods for measuring alveolar bone loss have also been proposed in the literature. Li *et al.* (14) have observed no differences in the accuracy of morphometric, histometric and microcomputed tomographic analyses for quantifying alveolar bone loss. Fernandes *et al.* (4) compared histometric and morphometric (linear) methods and concluded that both are capable of detecting differences in

bone height in rats. Kuhr *et al.* (12) have proposed a comparison between linear and area methods for evaluating alveolar bone loss morphometrically. They have measured areas in teeth with ligatures and their adjacent. When long periods of time were used, the area and linear measurements did not correlate as well. The authors then concluded that the linear method should only be used when slight differences in bone loss exist between experimental groups. Recently, Fine *et al.* (15) have proposed a direct visual method for evaluating alveolar bone loss. Linear and area measurements were compared without differences detected.

Considering that the literature still does not support a pattern of induced-periodontitis evaluation, the aim of the present study was to compare two methods for measurement of alveolar bone loss in pictures taken from defleshed maxillae of Wistar rats, trying to propose an estimation of area measurements by means of the linear data.

MATERIAL AND METHODS

Specimen Preparation

Sixty hemimaxillae defleshed and stained with methylene blue 1% were obtained from a previous study that induced alveolar bone loss by ligatures in two groups of fifteen Wistar rats during 9 weeks were used in the present study. Ligatures were placed around the right second maxillary molars and the contra lateral side remained as intra-group controls. Thus, the present study comprised 60 specimens (30 with and 30 without the presence of ligatures. Groups 1 and 2 represent exposure or not to alcohol intake.

A digital camera (Nikon D100®, Ayuthaia, Thailand) coupled in a tripod with medical lenses and minimal focal distance was used to take standardized pictures from the buccal and palatal aspects of each specimen. A millimeter ruler was photographed together with all specimens to validate measurement conversions. The examiner was unaware of the group distribution as well as of the ligature presence or absence. Alveolar bone loss was estimated using two different

measurement methods (linear and area) with an image analysis computer software (Image Tool 3.0, UTHSCSA, San Antonio, USA).

Linear Measurement of Alveolar Bone Loss

Five linear measurements (in mm) were made from the cemento-enamel junction to the alveolar bone crest in each specimen (buccally and palatally). Periodontal bone loss was defined as the mean of ten measurements performed in buccal and palatal aspects. **Figure 1** illustrates the linear measurements.

Area measurement of Alveolar Bone Loss

The area of alveolar bone loss was determined from the cemento-enamel junction to the alveolar bone crest limited by the distal aspect of the distal root and the mesial aspect of the mesial root. Area was defined as mean measurements of buccal and palatal aspects. **Figure 2** illustrates the area measurements.

Reproducibility

Before performing alveolar bone loss measurements, the examiner was trained and calibrated. Double-measurements of 20 specimens were performed with the interval of one week. A very high correlation was obtained between the 2 measurements verified by intra-class correlation coefficient (ICC=0.98).

Statistical Analysis

In groups 1 and 2, linear alveolar bone loss were obtained as the mean of ten measurements performed in buccal and palatal aspects. Total area bone loss was measured in buccal and palatal aspects and a mean of the two observations was calculated. The degree of association between the two methods utilized for

measuring alveolar bone loss and its relationship was calculated by Pearson's Correlation Test. The alpha level was set at .05.

RESULTS

Descriptive results obtained from morphometric measurements of mean alveolar bone loss in groups 1 and 2 (linear and area) are shown in **Table 1**.

Mean linear measurements of alveolar bone loss are expressed in mm. In teeth without ligature, alveolar bone loss was 0.37 ± 0.07 and 0.32 ± 0.07 for groups 1 and 2, respectively. In teeth with induced-periodontal breakdown, groups 1 and 2 exhibited alveolar bone loss of 0.84 ± 0.18 and 0.78 ± 0.14 respectively.

Mean area measurements of alveolar bone loss are expressed in mm^2 . In teeth without ligatures, groups 1 and 2 presented an area alveolar bone loss of 0.70 ± 0.15 and 0.61 ± 0.16 respectively. In teeth with ligatures, alveolar bone loss was of 1.50 ± 0.33 for group 1 and 1.37 ± 0.27 for group 2.

Pearson's Correlation Coefficient between linear and area measurements are shown in **Figure 3**. A correlation of 0.98 ($p < 0.001$) was verified, which means an almost perfect correlation between the two methods of analyzing alveolar bone loss.

A mathematic formula for estimating the area of alveolar bone loss taking only linear measurements was created and is: $A = 0.25 + (L \times 1.6)$, where A means Estimation of area and L means linear measurement.

DISCUSSION

The present article evaluated two different methods for measuring alveolar bone loss morphometrically. Linear and area measurements were performed in standardized digital pictures taken from defleshed maxillae (buccally and palatally). Person's correlation evidenced a strong correlation between the two methods.

Recently, animal studies have been extensively used for evaluating the impact of eventual risk factors influencing periodontal disease (5, 8, 16, 17). They

mainly concern studying the biological plausibility of the events. Nevertheless, very few of them have focused on methodological aspects that can influence the results. Some authors have conducted discussions concerning an accurate and easy method for evaluating alveolar bone loss (4, 12, 14, 15). Park *et al.* (11) have suggested Micro-Computed Tomographic for assessment of alveolar bone loss because of the significant agreement between examiners, reliability and reproducibility (ICC>0.99). On the other hand, Li *et al.* (14) have compared techniques of Micro-Computed Tomographic with morphometric and histometric measurements for assessment of alveolar bone loss and revealed accuracy in all three methods.

In the present study, we compared different morphometric methods for evaluating alveolar bone loss. The present findings are in disagreement with a previous similar study (12). Kuhr *et al.* (12) perceived differences between linear and area methods when evaluating alveolar bone loss in second molars and adjacent teeth in the longest period (60 days) of evaluation. The study concluded that area method can better assess bone loss when higher discrepancies are present between groups. In our investigation, both methods were capable of detecting bone loss changes even in a similar period evaluation (63 days). Moreover, morphometric analysis seems to be an easy, accurate and reproducible method for this purpose as long as Micro-Computed Tomographic is still an expensive way and histological analysis requires tissue preparation steps and substantial effort (14). Comparing the results of the present study with the study performed by Fine *et al.* (15), no important discrepancies could be assumed.

Based on the current experience of the present study, we can assume that the morphometric analysis consist on a easier method when evaluating only alveolar bone loss. The accuracy and the reproducibility of this method are less prone to errors in bone loss measurements. Despite linear measurements consist of a more simple way to detect alterations in bone level with less expense of time, both area and linear methods are capable to evaluate alveolar bone loss.

One highlight of the present study is the possibility of estimating area measurements from linear data and vice versa. This would be of interest since the

discussion about which measurement should be considered the gold standard still exist. This would allow one to try to convert measurements when interpreting different studies, thus allowing more realistic comparisons.

Further studies for evaluating different methodological aspects in experimental models are warranted for better understanding advantages and limitations of methods used for bone loss assessment.

CONCLUSION

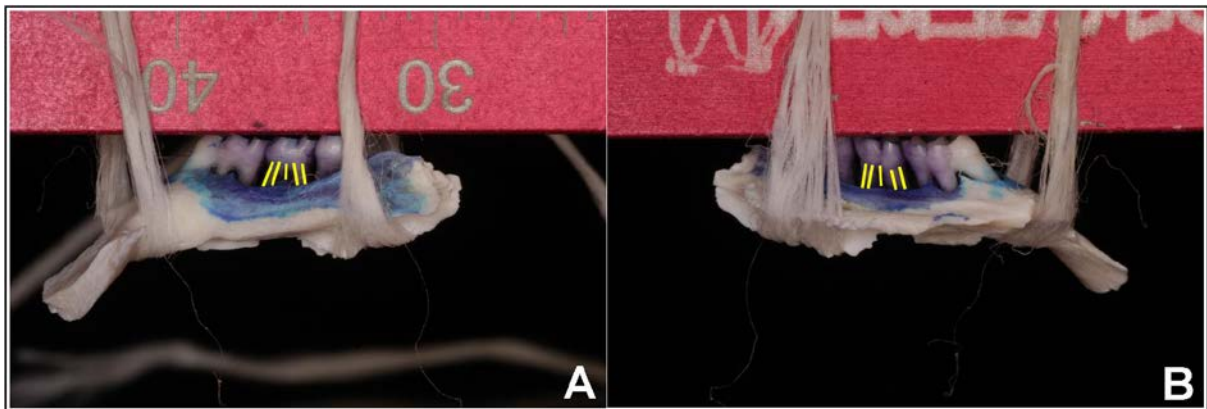
With the limitations of the present study, we can assume that linear and area methods are suitable for detecting changes in alveolar bone loss even in longer periods of time.

REFERENCES

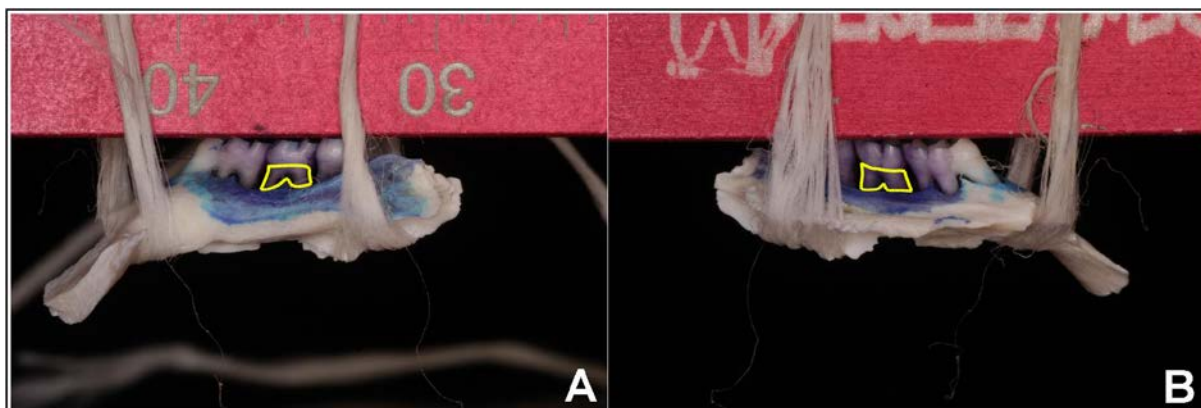
1. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:216-48.
2. Tabakoff B, Hoffman PL. Animal models in alcohol research. *Alcohol Res Health*. 2000;24(2):77-84.
3. Graves DT, Fine D, Teng YT, Van Dyke TE, Hajishengallis G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2008 Feb;35(2):89-105.
4. Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res*. 2007 Jul-Sep;21(3):216-21.
5. Cavagni J, Soletti AC, Gaio EJ, Rosing CK. The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Braz Oral Res*. 2005 Oct-Dec;19(4):290-4.
6. Gaio EJ, Fernandes MI, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Análise comparativa da altura óssea histométrica e morfométrica na periodontite induzida em ratos. *Anais da SBPqO*; 2004; 2004.
7. Irie K, Tomofuji T, Tamaki N, Sanbe T, Ekuni D, Azuma T, et al. Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. *J Dent Res*. 2008 May;87(5):456-60.
8. Susin C, Rosing CK. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. *Acta Odontol Scand*. 2003 Oct;61(5):273-7.
9. Dumitrescu AL, Abd-El-Aleem S, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):596-603.

10. Kesavalu L, Sathishkumar S, Bakthavatchalu V, Matthews C, Dawson D, Steffen M, et al. Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infect Immun*. 2007 Apr;75(4):1704-12.
11. Park CH, Abramson ZR, Taba M, Jr., Jin Q, Chang J, Kreider JM, et al. Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. *J Periodontol*. 2007 Feb;78(2):273-81.
12. Kuhr A, Popa-Wagner A, Schmoll H, Schwahn C, Kocher T. Observations on experimental marginal periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2004 Apr;39(2):101-6.
13. 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.
14. Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *J Periodontol*. 2007 Jun;78(6):1120-8.
15. Fine DH, Schreiner H, Nasri-Heir C, Greenberg B, Jiang S, Markowitz K, et al. An improved cost-effective, reproducible method for evaluation of bone loss in a rodent model. *J Clin Periodontol*. 2009 Feb;36(2):106-13.
16. Soletti AC, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of neonatal clomipramine in the pathogenesis of ligature-induced periodontitis in Lewis rats. *Acta Odontol Scand*. 2009;67(2):94-8.
17. Verzeletti GN, Gaio EJ, Rosing CK. Effect of methotrexate on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. *Acta Odontol Scand*. 2007 Nov;65(6):348-51.

ANEXO I – MANUSCRITO II

Figure 1 – Linear measurements in buccal (A) and palatal (B) aspects.

ANEXO II – MANUSCRITO II

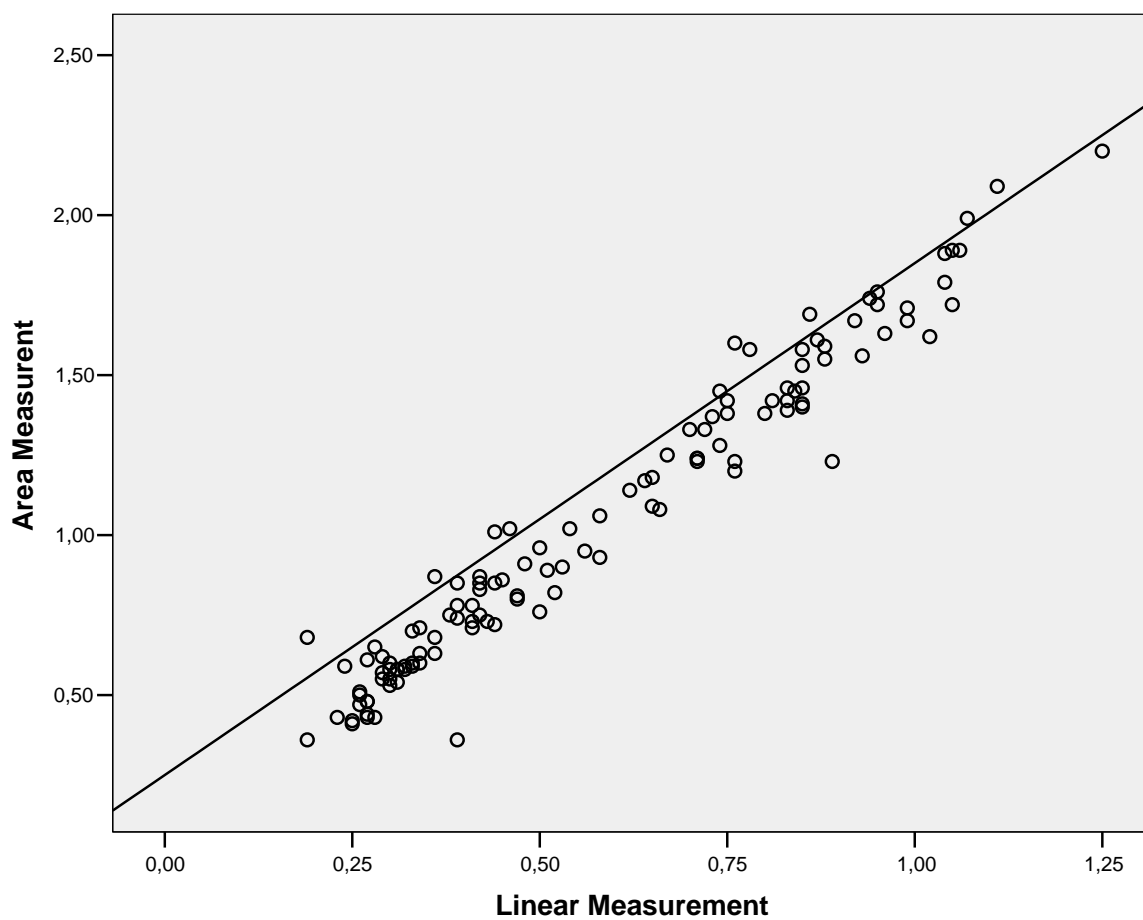
Figure 2 – Area measurements in buccal (A) and palatal (B) aspects.

ANEXO III – MANUSCRITO II

Table 1 – Results obtained from linear and area measurements in a morphometric evaluation.

	Linear Measurements (in mm)		Area Measurements (in mm ²)	
	Without ligature	With ligature	Without ligature	With ligature
Group 1	0.37±0.07	0.84±0.18	0.70±0.15	1.50±0.33
Group 2	0.32±0.07	0.78±0.14	0.61±0.16	1.37±0.27

ANEXO IV – MANUSCRITO II

Figure 3 – Pearsons Correlation between linear and area measurements.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente tese propôs-se a avaliar a influência do etanol em baixas concentrações sobre a doença periodontal induzida por meio de ligadura, em ratos Wistar, bem como comparar dois métodos distintos de avaliação da perda óssea em modelo animal de periodontite induzida.

A abordagem da possível relação do consumo de bebidas alcoólicas com a ocorrência das periodontites é relativamente nova. Até o presente momento, apenas dois estudos em modelo animal (Souza, Ricardo *et al.*, 2006; Irie, Tomofuji *et al.*, 2008), ambos realizados nos últimos 3 anos, correlacionaram a ingestão de álcool com doenças periodontais. Entretanto, a presente dissertação foi a primeira a aplicar um modelo de administração de etanol em concentrações mais brandas para avaliação de seu efeito na perda óssea alveolar. Verificou-se que os ratos que haviam recebido etanol (5%) como parte da dieta apresentaram uma menor perda óssea do que ratos do grupo controle, que receberam apenas água potável e ração. Apenas os dentes em que a doença periodontal não havia sido induzida (controle intra-grupo) apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0.04$). Provavelmente, o álcool em baixas concentrações, *per se*, possa exercer um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar. Contudo, a presença de ligaduras para indução de doença periodontal enseja uma resposta inflamatória aguda que pode ter mascarado os possíveis benefícios do álcool.

Os demais estudos realizados em animais utilizaram concentrações de álcool mais elevadas (variando de 10 a 36%) e verificaram uma maior perda óssea em ratos que receberam álcool como parte da dieta (Souza, Ricardo *et al.*, 2006; Irie, Tomofuji *et al.*, 2008). De certa maneira, a ambigüidade dos resultados corrobora com os achados da literatura sobre a dualidade dos efeitos do álcool sobre o sistema imune (Diaz, Montero *et al.*, 2002) de defesa e sobre mediadores inflamatórios sistêmicos (Romeo, Warnberg, Nova, Diaz, Gomez-Martinez *et al.*, 2007). A redução nos níveis de mediadores sistêmicos e aumento da imunocompetência promovida pelo consumo moderado de álcool têm servido como

base para explicação dos efeitos benéficos do álcool na prevenção de eventos cardiovasculares e ocorrência da aterosclerose (Kloner e Rezkalla, 2007). Possivelmente, um efeito benéfico do consumo de álcool sobre as doenças periodontais, que tem as bactérias patogênicas como fator etiológico primário, mas que envolvem a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro na sua etiopatogenia, possa futuramente ser estabelecido.

Assim como observado entre os estudos em animais, a grande maioria dos estudos realizados em humanos, essencialmente epidemiológicos de natureza transversal e longitudinal, foi realizada na última década. No que concerne a possibilidade de comparação entre os dados que estão surgindo e futuros estudos sobre os efeitos do álcool no periodonto, a definição de aspectos metodológicos básicos torna-se fundamental tanto para modelos em animais quanto para estudos em humanos (Kloner e Rezkalla, 2007).

A comparação e o estabelecimento de uma correlação entre dois métodos morfométricos distintos de avaliação de perda óssea foi um dos objetivos desta dissertação. Uma correlação quase perfeita entre os métodos de avaliação linear e de área permite-nos afirmar que ambos os métodos revelaram-se eficazes na quantificação da perda óssea alveolar. Estudos prévios também demonstraram preocupação semelhante e também não verificaram diferenças entre métodos utilizados para mensuração de perda óssea (Fernandes, Gaio *et al.*, 2007; Li e Amar, 2007). Demais aspectos como métodos adequados de administração de álcool na dieta, meios de indução da doença periodontal e tempo de realização do estudo são temas promissores para futuras investigações.

Da mesma forma, as investigações prévias sobre os efeitos do consumo de bebidas alcoólicas nas doenças periodontais em humanos, apresentam indefinições sobre terminologias básicas e inerentes ao tema, como, por exemplo, a definição de doses para os padrões de consumo distintos. A própria literatura das demais áreas médicas tem encontrado dificuldades na definição da quantidade de álcool que é contida em uma dose padrão, evidenciando contradições inclusive com padrões definidos pela OMS (Kloner e Rezkalla, 2007).

Apesar das limitações do presente estudo, a administração de baixas doses de álcool condizentes com o teor alcoólico da cerveja - bebida mais consumida no mundo (Who, 2004) - para ratos Wistar, demonstrou exercer um papel inibidor na perda óssea alveolar. Estudos futuros com baixas concentrações de álcool (situadas entre 1% e 10%) são aconselhados para a observação de uma dose máxima protetora. Em humanos, levantamentos populacionais com padrões e quantidades de consumo previamente definidas são fundamentais o entendimento do possível mecanismo protetor que o álcool parece exercer em baixas concentrações.

REFERÊNCIAS

Albert, C. M., J. E. Manson, *et al.* Moderate alcohol consumption and the risk of sudden cardiac death among US male physicians. Circulation, v.100, n.9, Aug 31, p.944-50. 1999.

Albert, M. A., R. J. Glynn, *et al.* Alcohol consumption and plasma concentration of C-reactive protein. Circulation, v.107, n.3, Jan 28, p.443-7. 2003.

Amaral Cda, S., R. R. Luiz, *et al.* The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. J Periodontol, v.79, n.6, Jun, p.993-8. 2008.

Bouchard, P., P. Boutouyrie, *et al.* Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. J Periodontol, v.77, n.3, Mar, p.479-89. 2006.

Calabrese, E. J. e L. A. Baldwin. Ethanol and hormesis. Crit Rev Toxicol, v.33, n.3-4, p.407-24. 2003.

Cavagni, J., A. C. Soletti, *et al.* The effect of dexamethasone in the pathogenesis of ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. Braz Oral Res, v.19, n.4, Oct-Dec, p.290-4. 2005.

Cohen, S., D. A. Tyrrell, *et al.* Smoking, alcohol consumption, and susceptibility to the common cold. Am J Public Health, v.83, n.9, Sep, p.1277-83. 1993.

Coleman, R. A., B. M. Young, *et al.* A practical method of chronic ethanol administration in mice. Methods Mol Biol, v.447, p.49-59. 2008.

Corrao, G., L. Rubbiati, *et al.* Alcohol and coronary heart disease: a meta-analysis. Addiction, v.95, n.10, Oct, p.1505-23. 2000.

De Souza, D. M. e R. F. Rocha. Low caloric value of ethanol itself increases alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis in male rats. Braz Oral Res, v.23, n.4, Oct-Dec, p.460-6. 2009.

Di Castelnuovo, A., S. Costanzo, *et al.* Alcohol dosing and total mortality in men and women: an updated meta-analysis of 34 prospective studies. Arch Intern Med, v.166, n.22, Dec 11-25, p.2437-45. 2006.

Diaz, L. E., A. Montero, *et al.* Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. Eur J Clin Nutr, v.56 Suppl 3, Aug, p.S50-3. 2002.

Dumitrescu, A. L., S. Abd-El-Aleem, *et al.* A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervation. J Clin Periodontol, v.31, n.8, Aug, p.596-603. 2004.

Duryee, M. J., L. W. Klassen, *et al.* Immunological response in alcoholic liver disease. World J Gastroenterol, v.13, n.37, Oct 7, p.4938-46. 2007.

Estruch, R., E. Sacanella, *et al.* Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial. Effects of wine on inflammatory markers. Atherosclerosis, v.175, n.1, Jul, p.117-23. 2004.

Fernandes, M. I., E. J. Gaio, *et al.* Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. Braz Oral Res, v.21, n.3, Jul-Sep, p.216-21. 2007.

Fine, D. H., H. Schreiner, *et al.* An improved cost-effective, reproducible method for evaluation of bone loss in a rodent model. J Clin Periodontol, v.36, n.2, Feb, p.106-13. 2009.

French, S. W., K. Miyamoto, *et al.* Ethanol-induced hepatic fibrosis in the rat: role of the amount of dietary fat. Alcohol Clin Exp Res, v.10, n.6 Suppl, p.13S-19S. 1986.

Gamble, L., C. M. Mason, *et al.* The effects of alcohol on immunity and bacterial infection in the lung. Med Mal Infect, v.36, n.2, Feb, p.72-7. 2006.

Gaziano, J. M., J. E. Buring, *et al.* Moderate alcohol intake, increased levels of high-density lipoprotein and its subfractions, and decreased risk of myocardial infarction. N Engl J Med, v.329, n.25, Dec 16, p.1829-34. 1993.

Gigleux, I., J. Gagnon, *et al.* Moderate alcohol consumption is more cardioprotective in men with the metabolic syndrome. J Nutr, v.136, n.12, Dec, p.3027-32. 2006.

Gronbaek, M. Epidemiologic evidence for the cardioprotective effects associated with consumption of alcoholic beverages. Pathophysiology, v.10, n.2, Apr, p.83-92. 2004.

Gronbaek, M., U. Becker, *et al.* Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease, and cancer. Ann Intern Med, v.133, n.6, Sep 19, p.411-9. 2000.

Hanna, E. Z., S. P. Chou, *et al.* The relationship between drinking and heart disease morbidity in the United States: results from the National Health Interview Survey. Alcohol Clin Exp Res, v.21, n.1, Feb, p.111-8. 1997.

Hijmering, M. L., D. W. De Lange, *et al.* Binge drinking causes endothelial dysfunction, which is not prevented by wine polyphenols: a small trial in healthy volunteers. Neth J Med, v.65, n.1, Jan, p.29-35. 2007.

Imhof, A., M. Froehlich, *et al.* Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. Lancet, v.357, n.9258, Mar 10, p.763-7. 2001.

Imhof, A., M. Woodward, *et al.* Overall alcohol intake, beer, wine, and systemic markers of inflammation in western Europe: results from three MONICA samples (Augsburg, Glasgow, Lille). Eur Heart J, v.25, n.23, Dec, p.2092-100. 2004.

Irie, K., T. Tomofuji, *et al.* Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. J Dent Res, v.87, n.5, May, p.456-60. 2008.

Jansson, L. Association between alcohol consumption and dental health. J Clin Periodontol, v.35, n.5, May, p.379-84. 2008.

Jayasinghe, R., G. Gianutsos, *et al.* Ethanol-induced suppression of cell-mediated immunity in the mouse. Alcohol Clin Exp Res, v.16, n.2, Apr, p.331-5. 1992.

Jerrells, T. R., D. Vidlak, *et al.* Alcoholic pancreatitis: mechanisms of viral infections as cofactors in the development of acute and chronic pancreatitis and fibrosis. J Leukoc Biol, v.81, n.2, Feb, p.430-9. 2007.

Kesavalu, L., S. Sathishkumar, *et al.* Rat model of polymicrobial infection, immunity, and alveolar bone resorption in periodontal disease. Infect Immun, v.75, n.4, Apr, p.1704-12. 2007.

Keys, A. The Seven Countries : a multivariate analysis of death and coronary heart disease. Harvard University, London, 1980.

Kloner, R. A. e S. H. Rezkalla. To drink or not to drink? That is the question. Circulation, v.116, n.11, Sep 11, p.1306-17. 2007.

Kongstad, J., U. A. Hvidtfeldt, *et al.* Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen City Heart Study. J Clin Periodontol, v.35, n.12, Dec, p.1032-9. 2008.

Kuhr, A., A. Popa-Wagner, *et al.* Observations on experimental marginal periodontitis in rats. J Periodontal Res, v.39, n.2, Apr, p.101-6. 2004.

Laranjeira, R., I. Pinsky, *et al.* Alcohol use patterns among Brazilian adults. Rev Bras Psiquiatr, Nov 13. 2009.

Li, C. H. e S. Amar. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. J Periodontol, v.78, n.6, Jun, p.1120-8. 2007.

Lieber, C. S. e L. M. Decarli. An experimental model of alcohol feeding and liver injury in the baboon. J Med Primatol, v.3, n.3, p.153-63. 1974.

Mandrekar, P., D. Catalano, *et al.* Inhibition of myeloid dendritic cell accessory cell function and induction of T cell anergy by alcohol correlates with decreased IL-12 production. J Immunol, v.173, n.5, Sep 1, p.3398-407. 2004.

_____. Moderate alcohol intake in humans attenuates monocyte inflammatory responses: inhibition of nuclear regulatory factor kappa B and induction of interleukin 10. Alcohol Clin Exp Res, v.30, n.1, Jan, p.135-9. 2006.

McClain, C. J., S. Barve, *et al.* Cytokines in alcoholic liver disease. Semin Liver Dis, v.19, n.2, p.205-19. 1999.

Nelson, S. e J. K. Kolls. Alcohol, host defence and society. Nat Rev Immunol, v.2, n.3, Mar, p.205-9. 2002.

Nishida, N., M. Tanaka, *et al.* Association of ALDH(2) genotypes and alcohol consumption with periodontitis. J Dent Res, v.83, n.2, Feb, p.161-5. 2004.

Okamoto, Y., S. Tsuboi, *et al.* Effects of smoking and drinking habits on the incidence of periodontal disease and tooth loss among Japanese males: a 4-yr longitudinal study. J Periodontal Res, v.41, n.6, Dec, p.560-6. 2006.

Park, C. H., Z. R. Abramson, *et al.* Three-dimensional micro-computed tomographic imaging of alveolar bone in experimental bone loss or repair. J Periodontol, v.78, n.2, Feb, p.273-81. 2007.

Pavia, C. S., M. La Mothe, *et al.* Influence of alcohol on antimicrobial immunity. Biomed Pharmacother, v.58, n.2, Mar, p.84-9. 2004.

Pitiphat, W., A. T. Merchant, *et al.* Alcohol consumption increases periodontitis risk. J Dent Res, v.82, n.7, Jul, p.509-13. 2003.

Rehm, J., T. K. Greenfield, *et al.* Assessment methods for alcohol consumption, prevalence of high risk drinking and harm: a sensitivity analysis. Int J Epidemiol, v.28, n.2, Apr, p.219-24. 1999.

Rehm, J., R. Room, *et al.* The relationship of average volume of alcohol consumption and patterns of drinking to burden of disease: an overview. Addiction, v.98, n.9, Sep, p.1209-28. 2003.

Romeo, J., J. Warnberg, *et al.* Moderate alcohol consumption and the immune system: a review. Br J Nutr, v.98 Suppl 1, Oct, p.S111-5. 2007.

_____. Changes in the immune system after moderate beer consumption. Ann Nutr Metab, v.51, n.4, p.359-66. 2007.

Ruiz, M., S. Ewig, *et al.* Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity. Am J Respir Crit Care Med, v.160, n.2, Aug, p.397-405. 1999.

Sakki, T. K., M. L. Knuuttila, *et al.* Association of lifestyle with periodontal health. Community Dent Oral Epidemiol, v.23, n.3, Jun, p.155-8. 1995.

Salerno, J. A., C. Waltenbaugh, *et al.* Ethanol consumption and the susceptibility of mice to *Listeria monocytogenes* infection. Alcohol Clin Exp Res, v.25, n.3, Mar, p.464-72. 2001.

Shimazaki, Y., T. Saito, *et al.* Relationship between drinking and periodontitis: the Hisayama Study. J Periodontol, v.76, n.9, Sep, p.1534-41. 2005.

Shizukuishi, S., N. Hayashi, *et al.* Lifestyle and periodontal health status of Japanese factory workers. Ann Periodontol, v.3, n.1, Jul, p.303-11. 1998.

Soletti, A. C., E. J. Gaio, *et al.* Effect of neonatal clomipramine in the pathogenesis of ligature-induced periodontitis in Lewis rats. Acta Odontol Scand, v.67, n.2, p.94-8. 2009.

Souza, D. M., L. H. Ricardo, *et al.* Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. Braz Oral Res, v.23, n.3, Jul-Sep, p.326-32. 2009.

_____. The effect of alcohol consumption on periodontal bone support in experimental periodontitis in rats. J Appl Oral Sci, v.14, n.6, Dec, p.443-7. 2006.

Susin, C. e C. K. Rosing. Effect of variable moderate chronic stress on ligature-induced periodontal disease in Wistar rats. Acta Odontol Scand, v.61, n.5, Oct, p.273-7. 2003.

Szabo, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. Alcohol Alcohol, v.34, n.6, Nov-Dec, p.830-41. 1999.

Szabo, G. e P. Mandrekar. A recent perspective on alcohol, immunity, and host defense. Alcohol Clin Exp Res, v.33, n.2, Feb, p.220-32. 2009.

Szabo, G., P. Mandrekar, *et al.* Regulation of human monocyte functions by acute ethanol treatment: decreased tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and elevated interleukin-10, and transforming growth factor-beta production. Alcohol Clin Exp Res, v.20, n.5, Aug, p.900-7. 1996.

Tabakoff, B. e P. L. Hoffman. Animal models in alcohol research. Alcohol Res Health, v.24, n.2, p.77-84. 2000.

Tezal, M., S. G. Grossi, *et al.* The effect of alcohol consumption on periodontal disease. J Periodontol, v.72, n.2, Feb, p.183-9. 2001.

_____. Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. J Clin Periodontol, v.31, n.7, Jul, p.484-8. 2004.

Thakker, K. D. An overview of health risks and benefits of alcohol consumption. Alcohol Clin Exp Res, v.22, n.7 Suppl, Oct, p.285S-298S. 1998.

Verzeletti, G. N., E. J. Gaio, *et al.* Effect of methotrexate on alveolar bone loss in experimental periodontitis in Wistar rats. Acta Odontol Scand, v.65, n.6, Nov, p.348-51. 2007.

Who. Global Status Report on Alcohol 2004: Department of Mental Health and Substance Abuse 2004.