

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

**ESTUDOS SOBRE A RELAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE ÁLCOOL E
DOENÇAS PERIODONTAIS**

Marcus Comparsi Wagner

Porto Alegre, RS, Julho de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Wagner, Marcius Comparsi

Estudos sobre a relação entre o consumo de álcool e doenças periodontais / Marcius Comparsi Wagner. -- 2015.

73 f.

Orientador: Cassiano Kuchenbecker Rösing.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Doenças periodontais. 2. Consumo de álcool. 3. Resveratrol. 4. Marcadores Inflamatórios. 5. Ratos Wistar. I. Kuchenbecker Rösing, Cassiano, orient. II. Título.

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

Linha de pesquisa:

Epidemiologia, etiopatogenia e repercussão das doenças da cavidade bucal e estruturas anexas.

**ESTUDOS SOBRE A RELAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE ÁLCOOL E
DOENÇAS PERIODONTAIS**

Marcus Comparsi Wagner

Orientador: Prof. Dr. Cassiano K. Rösing

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Doutorado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para a obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica/Periodontia.

Porto Alegre, RS, Julho de 2015

RESUMO

O consumo de álcool tem sido considerado um problema de saúde pública. Entretanto, também existem evidências de eventuais benefícios do consumo leve a moderado de algumas bebidas alcoólicas, no que se refere a doenças crônicas não transmissíveis. As doenças periodontais, sendo a sexta doença crônica mais prevalente, também têm sido associadas ao consumo de álcool com resultados controversos. Esta tese avaliou, através de três artigos a relação entre consumo de álcool e doenças periodontais. O primeiro artigo de divulgação, tem por objetivo alertar a profissão a respeito do estado atual do conhecimento em relação a associação entre álcool e doenças periodontais. O segundo artigo é um estudo experimental em modelo animal que avaliou o efeito da dependência química álcool sobre desfechos periodontais. Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas na perda óssea alveolar e secreção de TNF- α . O terceiro artigo, também em modelo animal, abordou o consumo do vinho tinto e valeu-se de controles total, álcool a 12%, suco de uva e resveratrol. A análise de ocorrência de periodontite espontânea demonstrou que o vinho tinto tem potencial protetor para a perda óssea alveolar e secreção de TNF- α . Os resultados encontrados nessa tese são instigantes e estão em linha com a literatura que demonstra uma relação do tipo curva J entre álcool e doenças periodontais, na qual até um determinado nível, o fator comporta-se como protetor. Assim, essa relação deve ser considerada na abordagem clínica, sem incentivo ao consumo, mas compreendendo até onde este é tolerável e/ou benéfico no que se refere a doenças periodontais.

Palavras - chave: periodontite, consumo de álcool, vinho tinto, resveratrol, marcadores inflamatórios, ratos Wistar.

ABSTRACT

Alcohol consumption has been considered a public health problem. Otherwise, there is evidence of eventual benefits of a light to moderate consume of some alcoholic beverage, in relation to non-transmissible chronic disease. The periodontal diseases, being the sixth most prevalent chronic disease, also have been associated to alcohol consumption with controversial results. This thesis evaluated, through three articles the relationship between alcohol consumption and periodontal diseases. The first article has the objective of alerting the professionals about the actual knowledge about the relationship between alcohol and periodontal diseases. The second article is an experimental study in animal model which evaluated the alcohol dependence over periodontal outcomes. The results did not show statistically significant differences in alveolar bone loss and TNF- α secretion. The third article, also in animal model, studied the red wine consumption and used total controls, 12% alcohol, grape juice and resveratrol. The analysis of the occurrence of spontaneous periodontitis demonstrated that red wine has a protector potential for alveolar bone loss and TNF- α secretion. The results found in this thesis are curious and they are in line with the literature that demonstrates a relationship like J-curve between alcohol and periodontal diseases, until some level, the factor behave as protector. So, this relation must be considered in clinical approaches, without encouraging the consumption, but understanding how much is tolerable and/or benefit according to periodontal diseases.

Keywords: periodontitis, alcohol consumption, wine, resveratrol, inflammatory markers, Wistar rats.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha esposa Karen e minha filha Beatrice que são os pilares de minha vida. Todo o esforço e dedicação para esta Tese de Doutorado é resultado do amor incondicional que recebo de vocês a cada dia de minha vida.

Obrigado por tudo.

Amo vocês duas!!!

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a toda a minha família pelo apoio e pela compreensão nos meus momentos de ausência para a construção desta Tese. Novamente agradecer a minha esposa Karen pelo seu apoio a amor incondicional, sem os quais, nada disso teria sido possível.

Os agradecimentos a seguir não têm ordem de importância, pois todos foram fundamentais e tiveram um mesmo peso para que este trabalho fosse realizado:

- A minha irmã profa. Dra. Sandrine Comparsi Wagner e sua colega profa. Dra. Helena Schirmer (ambas da UFCSPA) pela ajuda na elaboração da metodologia do estudo, conselhos e revisão dos artigos e da Tese;
- Ao meu orientador, prof. Dr. Cassiano K. Rösing que, com grande maestria, soube me reger e guiar durante estes anos de doutorado. Este trabalho também é fruto de todo o seu apoio, dedicação e orientação. Muito obrigado Cassiano;
- Ao setor de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRGS, representados pelo prof. Dr. Vinicius Carrard e prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho por aceitarem fazer parte deste projeto de pesquisa e cedendo o espaço deles junto à Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre para a execução da parte experimental deste projeto;
- A toda equipe da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (enfermeiros, médicos-veterinários, auxiliares, etc.) pela calorosa recepção e por todo apoio durante o tempo que os animais ficaram sob seus cuidados; além de todo o carinho e dedicação que tiveram com os animais;
- Aos alunos de iniciação científica Vagner Soster e Vanessa Brum e ao colega de doutorado Luciano Jesus pela parceria durante a execução de toda a parte experimental inclusive nos feriados de Natal e Reveillon, um muito obrigado;

- Ao grupo Vinícola Miolo de Bento Gonçalves, RS, que, gentilmente, forneceu todo o vinho tinto e suco de uva utilizados neste estudo;
- Aos colegas de doutorado, hoje professores da faculdade de odontologia da UFRGS, Eduardo José Gaio e Juliano Cavagni pelo auxílio tanto na elaboração do projeto quanto na fase experimental e revisão final deste trabalho;
- À profa. Dra. Alessandra Peres e seu aluno de mestrado Gilson Pires Dorneles da UFCSPA pela análise do soro dos animais;
- À biomédica Dra. Caroline Dani que analisou tanto o suco de uva quanto o vinho tinto utilizados neste estudo quanto aos parâmetros calóricos e quantidade de resveratrol contidos, parâmetros os quais foram necessários para o cálculo da quantidade de calorias ingeridas pelos animais;
- À farmácia Equilibrium de Porto Alegre que desenvolveu e produziu o resveratrol utilizado neste estudo;

Um muito obrigado a todos! Cada um é uma parte essencial desta Tese de Doutorado!

Sumário

1. Apresentação	9
2. Antecedentes	10
2.1. Consumo de álcool	10
2.2. Consumo de álcool e doenças periodontais	11
2.2.1. Estudos em animais	12
2.2.2. Estudos em humanos	13
2.3. Efeitos do consumo de vinho tinto e suco de uva para o organismo	14
2.4. Resveratrol	16
3. Objetivos	18
3.1. Geral	18
3.2. Específicos	18
4. Artigos da Tese	19
4.1. Artigo 1: Álcool como possível modulador das periodontites	19
4.2. Artigo 2: Effect of 15% alcohol dependence on alveolar bone loss and TNF- α secretion in Wistar rats	27
4.3. Artigo 3: Red wine consumption decreases the occurrence of spontaneous periodontitis and TNF- α levels in Wistar rats	47
5. Considerações finais	65
6. Referências bibliográficas	69

1. Apresentação

Esta tese de doutorado é composta por três artigos.

O primeiro artigo é uma revisão de literatura sobre a relação do consumo de álcool e as doenças periodontais em humanos, já publicado, em uma revista de divulgação com foco em cirurgiões-dentistas clínicos interessados em atualização profissional.

O segundo e o terceiro artigos são trabalhos de pesquisa em modelo animal. O segundo artigo estuda a relação entre a dependência de álcool a 15% sobre a perda óssea alveolar induzida e espontânea em ratos Wistar e a secreção de TNF- α . O terceiro artigo estuda a relação entre o consumo de vinho tinto e seus componentes de forma isolada (suco de uva, álcool a 12% e resveratrol) sobre a ocorrência de periodontite espontânea e níveis de TNF- α e IL-6 em ratos Wistar.

O detalhamento sobre as metodologias utilizadas em cada artigo encontra-se no corpo de cada um. Tanto o segundo quanto o terceiro artigo caracterizam-se por um modelo animal, prospectivos, randomizados, cegos e controlados por grupo controle. Ao final desta tese, considerações finais procurando conjugar informações dos três artigos são apresentadas.

2. Antecedentes

2.1. Consumo de álcool

O consumo de álcool representa na sociedade atual um grande problema de saúde pública, resultando em milhões de mortes anualmente, sendo também precursor de discussões e violência. Seu impacto negativo pode se espalhar através de comunidades ou países, influenciando nos níveis e padrões de consumo ao redor do mundo. Um relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre o consumo de álcool estima que o consumo excessivo de álcool ($\geq 40\text{g}$ de álcool / dia para homens e $\geq 20\text{g}$ de álcool / dia para mulheres) seja responsável por aproximadamente 2,5 milhões de mortes no mundo (OMS, 2011). Para melhor compreensão este mesmo relatório quantifica a dose de álcool da seguinte maneira: bebidas destiladas (dose = 25mL contendo 8g de álcool puro), cerveja (dose = 200mL contendo 8g de álcool puro) e vinho tinto (dose = 100mL contendo 9,6g de álcool puro). Também é demonstrado neste relatório que o consumo de álcool é o terceiro maior fator de risco mundial para doenças e condições incapacitantes, sendo que, em países pobres ele é o principal fator de risco.

Dados de 2005 mostram que, dentre as pessoas com mais de 15 anos de idade que consomem algum tipo de bebida alcoólica, o consumo per capita mundial anual é de 6,13 litros de álcool puro, sendo que no Brasil este valor é de 9,2 litros de álcool puro ou 18,51 litros de bebida alcoólica (24,38 litros para homens e 10,62 litros para mulheres) sendo que a cerveja é a bebida de eleição (54%) seguida pelos destilados (40%) e vinho (6%) (OMS, 2013).

A literatura médica mostra que um consumo elevado de álcool pode levar a complicações no fígado, problemas cardiovasculares e problemas comportamentais (McClain *et al.*, 1999; Meyerhoff *et al.*, 2005; Mukamal *et al.*, 2006). Por outro lado, o consumo moderado de álcool tem sido relacionado a menores índices de marcadores inflamatórios no organismo. Um estudo com aproximadamente 1400 profissionais da saúde mostrou que, tanto homens quanto mulheres que faziam um consumo moderado de álcool possuíam menores taxas de proteína C reativa, Interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa, o que está relacionado também a um menor risco para doenças

coronarianas (Pai *et al.*, 2006). Este comportamento do álcool no organismo (fator de risco e fator de proteção) é explicado pelo fenômeno chamado na bioestatística de curva J, onde até um determinado ponto um agente é considerado fator de proteção e, a partir deste ponto, fator de risco. O fenômeno da curva J tem sido bastante estudado principalmente para problemas de hipertensão desde o final dos anos 80 (Cruickshank, 1988) até os dias atuais (Tanna e Bangalore, 2015). Quanto ao consumo de álcool, o grande problema tem sido em determinar este ponto de corte, tendo em vista que existem diferenças quanto ao tipo de bebida consumida, teor alcoólico, quantidade ingerida, questões referentes à biodisponibilidade no organismo e questões culturais.

2.2. Consumo de álcool e doenças periodontais

As doenças periodontais são doenças infecto-inflamatórias que acometem os tecidos de sustentação e proteção do dente e são basicamente causadas por bactérias (Socransky *et al.*, 1998). As formas mais comuns são as gengivites e as periodontites (Armitage, 1999; Flemmig, 1999; Mariotti, 1999). As gengivites acometem aproximadamente 100% da população (considerando-se pelo menos um sítio sangrante por indivíduo), porém a ocorrência das periodontites é bastante variável. Em relação à periodontite, nos Estados Unidos, a prevalência de indivíduos com mais de 30 anos com profundidade de sondagem (PS) \geq 5mm foi de 8,9%, enquanto que a perda de inserção clínica (NIC) \geq 5mm foi de 19,9% (Albandar, Brunelle e Kingman, 1999). No Brasil, a prevalência de indivíduos com pelo menos um dente com NIC e PS \geq 5mm foi de 79% e 65% respectivamente (Susin *et al.*, 2004).

Quanto às doenças periodontais, não está clara a relação entre o consumo de álcool e a progressão da doença periodontal. A literatura mostra que o álcool pode modificar o processo saúde-doença periodontal pela interferência com a resposta do hospedeiro, através da modulação de mediadores químico-inflamatórios (McClain *et al.*, 1999; Szabo, 1999). Estudos tanto em animais quanto em humanos têm sido realizados para aferir qual o real efeito do consumo do álcool (quantidade e tipo de bebida consumida) sobre os tecidos periodontais.

2.2.1. Estudos em animais

Modelos animais permitem aos pesquisadores a utilização de métodos que não seriam éticos em pesquisas em humanos, principalmente em relação à administração de drogas que tenham consequências físicas e patológicas (Tabakoff e Hoffman, 2000). Dentre os modelos animais existentes, ratos têm sido bastante utilizados, pois é possível a indução de uma doença periodontal que apresenta características muito semelhantes àquela observada em humanos, dentre elas mesmo padrão de perda óssea, microbiota e mediadores inflamatórios (Klausen, 1991).

Estudos onde ratos foram expostos a um alto consumo de álcool (solução alcoólica com concentração igual ou maior do que 20%) mostraram uma associação entre consumo de álcool e perda óssea alveolar induzida por ligadura (Souza *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2009). O consumo de álcool a 36% (Irie *et al.*, 2008) foi responsável por um aumento na inflamação periodontal, no estresse oxidativo, na produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), além de aumentar a infiltração de leucócitos polimorfonucleares e dano oxidativo gengival, aumentando a gravidade da inflamação periodontal em dentes com ligadura. Em animais onde a doença periodontal foi induzida pela aplicação de lipopolissacarídeos de *Porphyromonas gingivalis* diretamente no tecido gengival três vezes por semana, o consumo de álcool a 20% foi responsável por um aumento na condição inflamatória apenas nas áreas sem aplicação do desafio microbiano (Surkin *et al.*, 2014). A literatura mostra também que o consumo crônico de álcool por um curto período de tempo (12 dias) pode representar um aumento de risco para a doença periodontal em ratos devido ao aumento na expressão de marcadores inflamatórios como interleucina 1 β (IL-1 β) e óxido nítrico (Dantas *et al.*, 2012). Animais expostos a uma alta concentração diária de álcool de 6,5g de álcool puro / Kg de animal / dia via gavagem [o que seria equivalente a um animal de 300g ingerir aproximadamente 200mL de cerveja (5% de álcool) por dia] durante 55 dias tiveram maior perda óssea alveolar espontânea comparados ao grupo controle (Bannach *et al.*, 2015).

Por outro lado, o consumo de álcool em baixa concentração (5%) está inversamente relacionado à perda óssea espontânea, mostrando-se como um fator de proteção (Lieberman, *et al.*, 2011), assim como o consumo de álcool a 20% via gavagem também está relacionado a menores índices de perda óssea

espontânea (Oballe *et al.*, 2014); essa situação chega ao ponto de não haver uma diferença estatística entre os grupos experimentais tanto no lado com ligadura quanto no lado sem ligadura quando os animais são expostos a um consumo de álcool a 15% de forma espontânea (Wagner *et al.*, 2013).

Estes resultados conflitantes podem ser explicados devido à metodologia utilizada para consumo de álcool (gavagem ou ingestão espontânea), tipo de doença periodontal (induzida ou espontânea), tempo de estudo (12 dias a 55 dias) e forma de análise da perda óssea (análise histológica, morfometria, radiografias e tomografias).

2.2.2. Estudos em humanos

Não existem ensaios clínicos que analisaram a questão do consumo de álcool e doenças periodontais em humanos. As evidências provêm de estudos de caso-controle, observacionais transversais e longitudinais.

Em relação aos estudos de caso-controle, os resultados em indivíduos alcoólatras mostram que, quanto maior a perda de inserção clínica, maior a concentração da enzima Gama Glutamil Transferase (GGTP), que é uma enzima que mede a quantidade de álcool no sangue do indivíduo (Khocht *et al.*, 2003). A literatura também mostra que dependentes químicos do álcool apresentam maiores perdas de inserção clínica e profundidade de sondagem comparados com não-dependentes, além de existir uma relação positiva entre dependência química e níveis de inserção e profundidade de sondagem (Amaral, *et al.*, 2008). Este mesmo grupo mostrou que indivíduos dependentes apresentam também maiores contagens de colônias bacterianas do grupo laranja, vermelho e *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans* (Aa) no meio subgengival comparados a não-dependentes (Amaral, *et al.*, 2011). Mais recentemente foi demonstrado que indivíduos dependentes químicos e que possuem doença periodontal destrutiva apresentam piores parâmetros clínicos e microbiológicos e também uma alteração imunológica comparados a não-dependentes (Lages *et al.*, 2015).

Quanto aos estudos transversais e longitudinais, a literatura tem apresentado uma relação positiva entre consumo de álcool e doença

periodontal, independente da quantidade de álcool consumida, da metodologia utilizada para aferição do consumo de álcool (questionários), da população alvo (amostras de conveniência, levantamentos epidemiológicos), do tipo de exame periodontal realizado (radiografias, exames completos, exames parciais, CPITN), da definição de doença ou progressão de doença periodontal (nível de inserção clínica, profundidade de sondagem, perda óssea radiográfica) e do tempo de acompanhamento (2 a 20 anos) (Tezal *et al.*, 2001; Pitiphat *et al.*, 2003; Nishida *et al.*, 2004; Tezal *et al.*, 2004; Shimazaki *et al.*, 2005; Nishida *et al.*, 2010; Park *et al.*, 2014; Hach *et al.*, 2015).

Por outro lado, a literatura também mostra que um consumo moderado de álcool pode ser considerado um fator de proteção para as doenças periodontais quando comparado com consumidores pesados e não-consumidores (Bouchard *et al.*, 2006) e que, o consumo de vinho tinto pode estar associado inversamente à perda de inserção periodontal quando comparados a outros tipos de bebidas alcoólicas (Kongstad *et al.*, 2008). Um estudo demonstrou que o consumo de vinho tinto é um fator de proteção às doenças periodontais em pessoas do sexo masculino e que o consumo de cerveja para as mulheres representa um fator de risco às doenças periodontais (Susin *et al.*, 2014).

2.3. *Efeitos do consumo de vinho tinto e suco de uva para o organismo*

Dentre as bebidas que contém álcool, o vinho tinto tem se destacado por seus possíveis benefícios para a saúde (Saleem e Basha, 2010). O consumo moderado de vinho tinto está sendo relacionado como um possível fator de proteção para doenças crônicas degenerativas como a doença cardiovascular (Leifert e Abeywardena, 2008a), doenças isquêmicas (Mannari *et al.*, 2010), perda da visão (Sheu, Liu e Chen, 2010), diminuição do colesterol (Natella *et al.*, 2011), melhorias na resposta do sistema imune inato e adaptativo (Magrone e Jirillo, 2010), acidente vascular cerebral (Elkind *et al.*, 2006), inclusive nas doenças periodontais (Bouchard *et al.*, 2006; Kongstad *et al.*, 2008; Susin *et al.*, 2014).

Um estudo dinamarquês demonstrou que mulheres que consomem vinho tinto regularmente possuem menores chances de ter perdas dentárias do que mulheres que não consomem vinho tinto. Para homens, esta relação foi observada para consumo de cerveja (Heegaard *et al.*, 2011).

A literatura tem procurado demonstrar que o efeito benéfico do consumo moderado de vinho tinto está relacionado às substâncias nele encontradas como o ácido fenólico e os polifenóis como os flavonoides (presentes em frutas, vegetais, nozes e sementes) (Hertog, Kromhout e Aravanis, 1995; Coimbra *et al.*, 2005). Foi observado também que o consumo diário de vinho tinto pode alterar a quantidade de placa aderida na superfície dental. Quando comparados a pessoas que consumiram apenas água, consumidores de vinho tinto apresentaram menor quantidade de placa acumulada tanto supra quanto subgingivalmente (Signoretto *et al.*, 2010). Esta relação parece ser devida aos flavonoides encontrados no vinho tinto que agem dificultando a adesão de colonizadores iniciais da película adquirida (como, por exemplo, bactérias do grupo *Streptococcus*), diminuindo, deste modo, a quantidade de placa formada (Signoretto *et al.*, 2006).

Os polifenóis têm recebido atenção devido ao seu amplo espectro antimicrobiano e a sua capacidade de suprimir alguns fatores de virulência microbiana (inibição do biofilme bacteriano, redução da adesão ao hospedeiro, e neutralização de toxinas bacterianas) além de mostrar sinergismo com antibióticos (Daglia, 2012). O potencial efeito protetor dos polifenóis está atribuído às suas propriedades antioxidativas, anti-radicais livres e quelação de alguns metais, além de inibir ou reduzir a ação de algumas enzimas como a telomerase (Naasani *et al.*, 2003), ciclooxigenase (O'Leary *et al.*, 2004; Hussain *et al.*, 2005) e lipooxigenase (Schewe *et al.*, 2001; Sadik, Sies e Schewe, 2003). Estudos mostram que os flavonoides possuem atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Actinomyces naeslundii* e bactérias gram-negativas como *Prevotella oralis*, *Prevotella melaninogenica*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum*, provavelmente devido aos seus diferentes mecanismos de ação (Cushnie *et al.*, 2007).

A ingestão de suco de uva rico em flavonoides diminui o estresse oxidativo associado às doenças cardiovasculares e inflamatórias (Davalos *et al.*, 2009). Polifenóis encontrados nas uvas foram testados em mulheres em um período pré e pós-menopausa. Os autores mostraram que a ingestão destes polifenóis altera o metabolismo de lipoproteínas, diminui o estresse oxidativo e marcadores inflamatórios e reduz o risco de doença cardíaca coronariana (Zern *et al.*, 2005). Em triatletas, a ingestão de suco de uva orgânico foi responsável por uma melhora na homeostase da glicose, ação antioxidante e aumento na função da microcirculação sanguínea, tendo um efeito positivo em atletas de resistência (Gonçalves *et al.*, 2011).

2.4. *Resveratrol*

Dentre os polifenóis estudados na literatura, o resveratrol é o que tem recebido maior destaque devido aos seus benefícios para a saúde, sendo encontrado no vinho tinto, no suco de uva, em grãos como o amendoim e em raízes de algumas plantas (Wu e Hsieh, 2011).

O resveratrol é um composto naturalmente produzido pelas plantas em resposta a infecções, principalmente de fungos, a estresse ambiental como clima, ozônio, luz UV, entre outras situações (Harikumar e Aggarwal, 2008).

Sabe-se que a casca fresca da uva contém aproximadamente 50 a 100 µg de resveratrol por grama, sendo que a concentração no vinho tinto varia entre 1,5 a 3 mg/L (Jang *et al.*, 1997). Esta substância tem sido alvo de pesquisas devido ao seu amplo espectro de ação como antioxidante, anti-inflamatório, antiviral, cardioprotetor (Lin *et al.*, 2008), neuroprotetor, quimiopreventivo, na proteção contra infecções e isquemia, redução da obesidade e doenças metabólicas associadas ao envelhecimento quanto terapia e prevenção (Baur *et al.*, 2006).

Estudos em ratos mostram que a administração crônica de álcool produz toxicidade, perda de peso, diminuição da ingestão de alimentos, bem como induz à hepatotoxicidade. Porém, quando é feita a suplementação da dieta com resveratrol estes efeitos adversos foram minimizados devido à inibição da peroxidação de lipídios e melhora da atividade de enzimas antioxidantes (Kasdallah-Grissa *et al.*, 2007).

A literatura mostra também que a administração de resveratrol é capaz de melhorar os efeitos causados por uma dieta altamente calórica (Baur *et al.*, 2006) e melhora a capacidade muscular (Lagouge *et al.*, 2006). Estes efeitos são devidos à ação da sirtuína 1 (SIRT1), enzima que é modulada pela ingestão de resveratrol. Diversos autores têm relacionado a ação das sirtuínas, dentre elas a SIRT1 e a Sirtuína 3 (SIRT3) como um possível caminho para aliviar os efeitos e complicações do envelhecimento, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Michan e Sinclair, 2007; Yamamoto, Schoonjans e Auwerx, 2007). As sirtuínas são responsáveis também pela modulação da resposta inflamatória através da diminuição da expressão de TNF- α (Wang *et al.*, 2013)

Quanto à relação entre a administração de resveratrol e as doenças periodontais, a literatura tem mostrado esta substância como fator de proteção tanto em nível antibacteriano como na resposta tecidual produzida pelo organismo. Estudos *in vitro* mostram que o resveratrol age contra a formação de colônias bacterianas de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e de *Porphyromonas gingivalis* (Pg), diminuindo a quantidade de colônias viáveis após 1 hora, resultando em nenhuma unidade formadora de colônias após 24 horas (O'Connor, Wong e Rabie, 2011). Em relação à resposta tecidual induzida pelo *Porphyromonas gingivalis*, o resveratrol diminuiu a expressão de óxido nítrico e a produção de citocinas pró-inflamatórias como Interleucina 1 β , Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 8 (IL-8), Interleucina 12 (IL-12) e TNF- α (Antonietta *et al.*, 2012). O resveratrol é responsável também pela ativação da SIRT1. Esta substância tem envolvimento na diferenciação de células do ligamento periodontal em células tipo osteoblastos, cuja implicação clínica pode auxiliar na regeneração do osso alveolar (Lee *et al.*, 2011).

Estudos em ratos mostram que o resveratrol foi responsável por menor destruição periodontal e níveis de Interleucina 17 (IL-17) quando comparados a um grupo controle que recebeu placebo, porém não foram observadas diferenças quanto aos níveis de Interleucina 1 β (IL-1 β) e Interleucina 4 (IL-4) (Casati *et al.*, 2013).

Frente a presença de resultados conflitantes na literatura no que tange a relação entre consumo de álcool e doenças periodontais e ao possível efeito benéfico do consumo de vinho tinto e/ou resveratrol, este estudo se justifica.

3. Objetivos

3.1. Geral

Avaliar os efeitos do consumo de álcool sob diferentes concentrações e do consumo de vinho tinto e seus componentes isoladamente (álcool, suco de uva e resveratrol) sobre a perda óssea alveolar espontânea e induzida por ligadura e sobre os marcadores inflamatórios em ratos Wistar.

3.2. Específicos

- a) Apresentar uma detalhada revisão de literatura sobre a relação entre o consumo de álcool e doenças periodontais em humanos;
- b) Comparar a perda óssea induzida por ligadura e espontânea em ratos Wistar dependentes químicos de uma solução de álcool a 15% e não-dependentes;;
- c) Comparar o mediador inflamatório Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) em ratos Wistar dependentes químicos de uma solução de etanol a 15% e não-dependentes;
- d) Comparar a perda óssea induzida por ligadura e espontânea em ratos Wistar submetidos ao vinho tinto, suco de uva, solução de álcool a 12% (mesma graduação do vinho) e resveratrol;
- e) Comparar a ocorrência de periodontite espontânea em ratos Wistar submetidos ao vinho tinto, suco de uva, solução de álcool a 12% (mesma graduação do vinho) e resveratrol;
- f) Comparar os mediadores inflamatórios sanguíneos Interleucina 6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) de ratos Wistar submetidos ao vinho tinto, suco de uva, solução de álcool a 12% (mesma graduação do vinho) e resveratrol

4. Artigos da Tese

4.1. Artigo 1

“Álcool como um possível modulador das periodontites”

Wagner, M.C.; Rösing, C.K.

Artigo publicado no periódico Perionews

ÁLCOOL COMO POSSÍVEL MODULADOR DAS PERIODONTITES

Alcohol as a possible modifier of periodontitis. A literature review

Marcus Comparsi Wagner¹

Cassiano Kuchenbecker Rösing²

RESUMO

O consumo de álcool tem sido estudado como um possível modulador das doenças periodontais. Estudos em animais e em humanos mostram uma relação de associação. Entretanto, a literatura sobre o tema ainda carece de mais estudos. A presente revisão da literatura aborda, através de estudos de caso-controle, transversais e longitudinais, a relação entre álcool e periodontite. Observa-se alta heterogeneidade nos estudos, amostras e critérios, tanto de doença periodontal quanto de consumo de álcool. Genericamente, os efeitos do consumo excessivo do álcool parecem refletir em piores condições periodontais. Entretanto, alguns estudos, especialmente observando consumo moderado de baixas doses de álcool, tendem a demonstrar uma relação oposta, sendo o álcool um eventual fator de proteção. A Odontologia necessita incorporar esse conhecimento em sua prática clínica.

Unitermos – Etanol; Bebidas alcoólicas; Periodontite; Risco.

ABSTRACT

Alcohol consumption has been studied as a possible modifier of periodontal diseases. Animal and human studies show such association. However, the literature about the subject needs more studies. The present literature review demonstrates, by means of case control, cross-sectional and longitudinal studies the relationship between alcohol and periodontitis. A high heterogeneity is observed among studies, samples, periodontal disease criteria, alcohol consumption cutoff points. Generically, the effects of excessive alcohol consumption seem to reflect in worse periodontal conditions. However, some studies, especially dealing with moderate consumption of low doses of alcohol tend to demonstrate an opposite relationship, being alcohol an eventual protective factor. Dentistry needs to incorporate this knowledge in its clinical practice.

Key words – Ethanol; Alcoholic beverages; Periodontitis; Risk.

¹Doutorando em Periodontia – Faculdade de Odontologia UFRGS.

²Professor titular do Depto. de Odontologia Conservadora (Periodontia) – Faculdade de Odontologia UFRGS.

Recebido em fev/2014

Aprovado em mar/2014

O CONSUMO DE ÁLCOOL REPRESENTA NA SOCIEDADE ATUAL UM GRANDE PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA, RESULTANDO EM MILHÕES DE MORTES ANUALMENTE E RESPONSÁVEL POR MUITAS CONDIÇÕES INCAPACITANTES¹. O CONSUMO ELEVADO DE ÁLCOOL ESTÁ RELACIONADO A PROBLEMAS CARDIOVASCULARES, HEPÁTICOS, COMPORTAMENTAIS, DENTRE OUTROS²⁻⁴. UM LEVANTAMENTO REALIZADO NAS AMÉRICAS MOSTRA QUE O BRASILEIRO CONSUME EM MÉDIA 18,51 LITROS DE BEBIDA ALCÓOLICA ANUALMENTE, SENDO QUE A BEBIDA DE ELEIÇÃO É A CERVEJA (54%), SEGUIDA PELOS DESTILADOS (40%) E O VINHO (6%)⁵. DENTRE AS BEBIDAS QUE CONTÊM ÁLCOOL, O VINHO TEM RECEBIDO ESPECIAL DESTAQUE, POIS SEU CONSUMO MODERADO TEM SIDO ASSOCIADO A MELHORIAS NO SISTEMA IMUNE⁶, CONTROLE DOS NÍVEIS DE COLESTEROL⁷ E FATOR DE PROTEÇÃO PARA DOENÇAS CRÔNICO-DEGENERATIVAS, COMO DOENÇA CARDIOVASCULAR⁸ E DOENÇAS ISQUÊMICAS⁹.

Introdução

O consumo de álcool representa na sociedade atual um grande problema de saúde pública, resultando em milhões de mortes anualmente e responsável por muitas condições incapacitantes¹. O consumo elevado de álcool está relacionado a problemas cardiovasculares, hepáticos, comportamentais, dentre outros²⁻⁴. Um levantamento realizado nas Américas mostra que o brasileiro consome em média 18,51 litros de bebida alcóolica anualmente, sendo que a bebida de eleição é a cerveja (54%), seguida pelos destilados (40%) e o vinho (6%)⁵. Dentre as bebidas que contêm álcool, o vinho tem recebido especial destaque, pois seu consumo moderado tem sido associado a melhorias no sistema imune⁶, controle dos níveis de colesterol⁷ e fator de proteção para doenças crônico-degenerativas, como doença cardiovascular⁸ e doenças isquêmicas⁹.

As doenças periodontais são infectoinflamatórias, que acometem os tecidos de sustentação e proteção dos dentes, sendo basicamente causadas por bactérias¹⁰. As formas mais comuns de doenças periodontais são as gengivites e as periodontites¹¹⁻¹². Um levantamento realizado na região metropolitana de Porto

Alegre (Estudo de Porto Alegre) mostra uma alta prevalência de periodontite (prevalência de 79% e 65% para nível de inserção clínica (NIC) e profundidade de sondagem (PS) \geq 5 mm respectivamente)¹³. Até o momento, a literatura mostra dois fatores de risco comprovados para as doenças periodontais: fumo¹⁴ e diabetes¹⁵. Assim, é importante que novos fatores que possam influenciar nesses problemas sejam estudados.

Quanto à relação entre o consumo de álcool e as doenças periodontais, a literatura apresenta resultados conflitantes, tanto em estudos animais quanto em humanos. Estudos mostram que o álcool pode modificar o processo de saúde-doença periodontal pela interferência com a resposta do hospedeiro^{2,16}. O objetivo desta revisão de literatura foi apresentar algumas evidências sobre a relação entre o consumo de álcool e as periodontites.

Revisão da Literatura

Para esta revisão, foram selecionados artigos que abordaram a doença periodontal e o consumo de álcool. Para facilitar a leitura, os artigos foram classificados de acordo com seu desenho experimental: estudos de caso-controle, estudos transversais e estudos longitudinais. Para melhor compreensão do leitor, dados de consumo de álcool dos estudos foram convertidos para sua equivalência em mililitros (ml) de cerveja (conteúdo de 5% de álcool puro), para facilitar na extrapolação dos resultados. O Quadro 1 mostra um resumo dos estudos encontrados.

Estudos de caso-controle

Tanto nos Estados Unidos quanto no Brasil, estudos foram conduzidos com grupos de alcoólatras (dependentes químicos de álcool), pareados com grupos de não dependentes químicos de álcool. Indivíduos alcoólatras apresentaram maior perda de inserção periodontal ($p=0,01$)¹⁷, maior contagem bacteriana de periodontopatógenos do grupo vermelho de Socranski e Haffajee ($p < 0,01$)¹⁸ e maiores índices da enzima gama glutamil transpeptidase (GGTP) – que é marcadora da função hepática e está alterada em alcoólatras – ($p < 0,05$)¹⁹, quando comparados com grupo de pessoas não alcoólatras.

Estudos transversais

Existe uma grande diversidade quanto à população estudada (amostras de conveniências, levantamentos epidemiológicos), critérios para diagnóstico de doença periodontal, métodos e pontos de corte para mensuração do consumo de álcool.

QUADRO 1 – ESTUDOS QUE ABORDAM A RELAÇÃO ENTRE ÁLCOOL E DOENÇAS PERIODONTAIS

Autor, ano do estudo e país	Amostra	Aferição de álcool	Exame periodontal e desfecho	Principais achados	Observações
Estudos de caso-controle					
Khocht, 2003 (EUA)	n=65 40 casos (alcoólatras) e 25 controles (não alcoólatras).	Análise enzima GGTP.	Exame periodontal completo. Desfecho de acordo com o NIC e presença de recessão gengival.	Não houve diferença entre alcoólatras e não alcoólatras. Correlação de Pearson para níveis de GGTP e NIC ($p < 0,05$).	Amostra de conveniência; fatores de confusão: má nutrição, estresse, depressão e fatores comportamentais.
Amaral et al, 2008 (Brasil)	n=98 49 casos e 49 controles.	Questionário Cage: duas respostas positivas = dependência química.	Exame periodontal completo. Desfecho de acordo com NIC médio (< 4 mm e ≥ 4 mm) e PS média (< 4 mm e ≥ 4 mm).	Encontrada relação entre dependência química e NIC ($p \leq 0,013$), e dependência química e PS ($p \leq 0,001$).	Amostra de conveniência; fatores de confusão: má nutrição, estresse, depressão e fatores comportamentais.
Amaral et al, 2012 (Brasil)	n=98 49 casos e 49 controles.	Questionário Cage: duas respostas positivas = dependência química.	Presença e contagem de bactérias periodontopatogênicas subgingivalmente.	Não há diferenças quanto aos tipos bacterianos presentes. Alcoólatras possuem maior contagem de Aa, Fn, Pg e Tf ($p < 0,001$).	Amostra de conveniência; fatores de confusão: má nutrição, estresse, depressão e fatores comportamentais.
Estudos transversais					
Tezal et al, 2001 (EUA)	n=1.371 661 H / 710 M 25-74 anos.	QF – doses/sem: < 5 vs. ≥ 5 < 10 vs. ≥ 10	Exame periodontal completo. Desfecho de acordo com NIC médio: saudável (0 a 1 mm), leve (1,1 a 2 mm), moderado (2,1 a 3 mm), alto (3,1 a 4 mm) e grave (≥ 4 mm).	< 5 vs. ≥ 5 : OR = 1,36 (IC 95% 1,02-1,80) para NIC grave. < 10 vs. ≥ 10 : OR = 1,44 (IC 95% 1,04-2,00) para NIC grave.	A relação dose-resposta encontrada pode ser atribuída à mudança do ponto de corte do consumo de álcool.
Tezal et al, 2004 (EUA)	n=13.198 6007 H / 6716 M > 20 anos.	QF – doses/sem: ≥ 5 , ≥ 10 , ≥ 15 e ≥ 20 .	Exame periodontal parcial – Nhanes III. Desfecho de acordo com NIC médio: $< 1,5$ mm e $\geq 1,5$ mm.	Quanto maior o consumo, maior a perda de inserção clínica com OR variando entre 1,22 (IC 95% 1,02-1,47 (\geq cinco doses/semana)) a 1,67 (IC 95% 1,25-2,23 (≥ 20 doses/semana)).	A relação dose-resposta encontrada pode ser atribuída à mudança do ponto de corte do consumo de álcool.
Nishida et al, 2004 (Japão)	n=372 operários. 290 H / 82 M 20-59 anos.	QF – gramas/dia: < 33 vs. ≥ 33 .	Exame periodontal completo. Desfecho de acordo com PS média: $< 3,5$ mm e $\geq 3,5$ mm.	Associação positiva OR 1,98 (IC 95% 1,04-3,76), quando existe consumo excessivo (≥ 33 g/dia), e doença avançada (PS $\geq 3,5$ mm).	Somente era registrado o maior valor por dente.
Shimazaki et al, 2005 (Japão)	n=961 378 H / 583 M 40-79 anos.	QF – gramas/dia: Não (0), Leve (0,1-14,9), Moderado (15-29,9), Pesado (≥ 30).	Exame periodontal parcial – Nhanes III. Desfecho de acordo com % de dentes: PS ≥ 4 mm: nenhum (0%), baixo (0,1 a 19,9%), médio (20 a 34,9%) e alto (≥ 35 %). NIC ≥ 5 mm: nenhum (0%), baixo (0,1 a 9,9%), médio (10 a 21,9%) e alto (≥ 22 %).	Indivíduos com consumo moderado e pesado de álcool apresentaram 2,7 (IC 95% 1,1-6,6) e 2,5 (IC 95% 1,1-5,7) vezes maior chance de ter ≥ 35 % dos dentes com PS ≥ 4 mm. Nenhuma relação com o NIC foi observada no modelo multivariado.	Estudo aninhado em um acompanhamento longitudinal de base populacional para o estudo de doenças cardiovasculares.
Akhter et al, 2005 (Japão)	n=1.089 Área rural. 531 H / 558 M 18-96 anos.	QF – doses/dia: < 2 vs. ≥ 2	Exame periodontal parcial – Nhanes III. Desfecho de acordo com o NIC médio: $< 1,5$ mm e $\geq 1,5$ mm.	Sem relação entre consumo de álcool e doença periodontal.	Não existe cálculo do consumo de álcool.
Bouchard et al, 2006 (França)	n=2.132 1.044 H / 1.088 M 35-64 anos.	QF – não consumidores, ocasionais e regulares.	Exame periodontal parcial. Desfecho de acordo com % de dentes: NIC localizada (≤ 30 % dentes > 5 mm) e generalizada (> 30 % dentes > 5 mm).	Tanto não consumidores quanto regulares possuem OR = 1,6 (IC 95% 1,2-2,2) para NIC grave, em comparação aos ocasionais.	Não especifica as categorias de consumo de álcool, nem cálculo da quantidade ingerida, apenas menciona que seguiu os parâmetros da OMS.

Estudos transversais					
Kongstad, 2008 (Dinamarca)	n=1.521 adultos	QF - diário.	Exame periodontal completo. Desfecho: presença de NIC média ≥ 3 mm SS no mínimo 25% dos dentes.	Homens que consomem no mínimo de 250 ml de vinho tinto por dia têm 76% menos chance de ter periodontite (OR = 0,24 (IC 95% 0,09-0,62)).	Relação não encontrada para mulheres.
Jamieson, 2010 (Austrália)	n=425 indivíduos nascidos entre 1987 e 1990.	Questionário de sim ou não.	CPITN. Desfecho de periodontite moderada/severa.	Não foi encontrada relação entre o consumo de álcool e a doença periodontal.	Estudo realizado com população marginalizada (baixo nível socioeconômico). Não existe cálculo do consumo de álcool.
Estudos longitudinais					
Ogawa et al, 2002 (Japão)	Dois anos. n=394 208 H / 186 M > 70 anos	QF - Diário ou não diário.	Exame periodontal completo. Desfecho: progressão de perda de inserção ≥ 3 mm ≥ 1 sítio.	Sem relação entre consumo de álcool e progressão de doença.	Não existe cálculo do consumo de álcool.
Pitphat et al, 2003 (EUA)	Dez anos. n=39.461 Homens 40-75 anos.	QF - gramas/dia: 0; 0,1-4,9; 5-14,9; 15-29,9; ≥ 30 .	Doença autorreportada: "Você já teve doença periodontal com perda óssea diagnosticada profissionalmente?"	Quanto maior o consumo, maior o risco para ocorrência de doença periodontal com RR variando entre 1,18 (IC 95% 1,04-1,35) e 1,24 (IC 95% 1,09-1,42).	Validação por meio de radiografias em uma subamostra.
Okamoto et al, 2006 (Japão)	Quatro anos. n=1.332 Homens 30-59 anos.	QF - gramas/dia: não consumidores < 20 g/dia vs. ≥ 20 g/dia.	Exame periodontal parcial - CPITN. Desfecho: escores 3 ou 4 no exame.	Sem relação entre o consumo de álcool e a doença periodontal. Associação apenas entre o consumo de álcool e a perda dentária na faixa mais jovem (30-39 anos).	CPITN Indivíduos saudáveis no início do estudo.
Jansson, 2008 (Suécia)	20 anos. n=513 indivíduos.	QF - cl/dia: > 5 cl álcool puro/dia. ≤ 5 cl álcool puro/dia.	Índice gengival de Ainamo e Bay, e radiografias.	Não houve relação entre o consumo de álcool e a doença periodontal.	Grande lacuna entre os dois exames. Falta de padronização e falta de exame completo.
Nishida, 2010 (Japão)	Quatro anos. n=183	QF - gramas/dia: < 33 vs. ≥ 33	Exame periodontal completo. Progressão de doença: aumento de 2 mm na PS em, no mínimo, dois dentes	Indivíduos que consomem ≥ 33 g de álcool/dia têm OR=3,54 (IC 95% 1,68-7,47) para ter progressão de doença.	PS é critério inflamatório e não de destruição.

N = amostra; H = homens; M = mulheres; QF = questionário de quantidade e frequência; Cage = questionário de dependência química de álcool; sem = semana; ml = mililitro; cl = centilitro; OR = odds ratio; RR = risco relativo; IC 95% = intervalo de confiança de 95%; GGTP (Gama Glutamil Transpeptidase - enzima marcadora da presença de álcool); PS = profundidade de sondagem; SS = sangramento a sondagem NIC = nível de inserção clínica; CPITN = índice comunitário de necessidade de tratamento periodontal; Aa = *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Fn = *Fusobacterium nucleatum*; Pg = *Porphyromonas gingivalis*; Tf = *Tannerella forsythia*; EUA = Estados Unidos; OMS = Organização Mundial da Saúde; Nhanes III = Third National Health and Nutrition Examination Survey; NPASES I = First National Periodontal and Systemic Examination Survey; HPFS = Health Professionals Follow-up Study; CCHS = Copenhagen City Heart Study; AABC = Australian Aboriginal Birth Cohort.

No Japão, uma amostra de 372 trabalhadores de uma fábrica foi examinada, sendo realizado um exame periodontal completo. Quanto ao consumo de álcool, ele foi dicotomizado entre pessoas que consumiam menos do que 33 g de álcool/dia (equivalente a 700 ml de cerveja - 5% de álcool - por dia) e pessoas que consumiam uma quantidade maior ou igual a 33 g de álcool por dia. Os resultados mostram que indivíduos que consomem uma quantidade maior ou igual a 33 g de álcool por dia têm maior risco de ter um elevado número de dentes com PS $\geq 3,5$ mm (OR = 1,98 (IC 95% 1,04-3,76), já ajustado para idade, gênero e índice de massa corporal)²⁰. Shimazaki investigou a relação entre consumo de álcool e doença periodontal em uma

população de 961 indivíduos com idade entre 40 e 79 anos. O exame periodontal conduzido foi o Community Periodontal Index (CPI), e os indivíduos foram categorizados de acordo com o consumo diário de álcool (0 - 14,9 g de álcool por dia, equivalente a até 375 ml de cerveja (5%) por dia, 15 - 29,9 g de álcool por dia, equivalente de 375 ml até 750 ml de cerveja (5%) por dia, e ≥ 30 g de álcool por dia, equivalente a mais de 750 ml de cerveja (5%) por dia). O estudo mostrou que indivíduos que consomem entre 15-29,9 g de álcool por dia e ≥ 30 g de álcool por dia possuem um OR de 2,7 (IC 95% 1,1-6,6) e 2,5 (IC 95% 1,1-5,7), respectivamente, de terem mais de 35% dos dentes com PS ≥ 4 mm²¹.

Na França, foram examinados 2.132 indivíduos com idade entre 35 e 64 anos, e realizado exame periodontal completo. O consumo de álcool foi categorizado em não consumidores, consumidores ocasionais e consumidores regulares (não foi especificada a quantidade de álcool em cada categoria). O estudo mostra que consumidores ocasionais têm 38% menos risco de ter NIC (nível de inserção clínica) > 5 mm²², quando comparados a não consumidores e consumidores regulares. Este resultado vai ao encontro dos achados de Kongstad, em um levantamento dinamarquês com 1.521 adultos, demonstrando que homens que consomem no mínimo 250 ml de vinho tinto têm 76% menos chance de apresentar periodontite (OR=0,24 - IC 95% 0,09-0,62)²³.

Nos Estados Unidos, 1.371 pessoas com idade entre 25 e 74 anos foram submetidas a um exame completo periodontal e, para efeitos de comparação, foram feitas duas análises: a primeira era para quem consumia uma quantidade maior ou igual a cinco doses de álcool por semana (≥ 250 ml de cerveja por dia), contra quem consumia uma quantidade menor do que cinco doses de álcool por semana; e a segunda foi feita para quem consumia uma quantidade maior ou igual a dez doses de álcool por semana (≥ 500 ml de cerveja por dia), contra quem consumia uma quantidade menor do que dez doses de álcool por semana. Tanto na primeira análise quanto na segunda, quem consome ≥ 5 doses de álcool por semana e ≥ 10 doses de álcool por semana, apresenta maior risco de perda de inserção severa (OR=1,36 - IC 95% 1,02-1,80 e 1,44 - IC 95% 1,04-2,00, respectivamente) e sangramento gengival (OR=1,65 - IC 95% 1,22-2,23 e 1,62 - IC 95% 1,12-2,33, respectivamente), comparado a quem consome < 5 doses de álcool por semana e < 10 doses de álcool por semana²⁴. O 3º Levantamento Nacional de Saúde e Nutrição (Nhanes III) – n=13.198, também realizado nos EUA, mostrou uma relação de dose-resposta entre o consumo de álcool e a doença periodontal. Quanto maior o consumo de álcool, maior o risco para ter NIC médio $\geq 1,5$ mm (OR variando de 1,22 - IC 95% 1,02-1,47 a 1,67 - IC 95% 1,25-2,23)²⁵.

Estudos longitudinais

Foram realizados dois estudos de incidência de doença, nos quais indivíduos saudáveis foram acompanhados durante quatro anos e depois foi verificada a incidência de doença periodontal nestes grupos. O primeiro estudo, realizado nos Estados Unidos, acompanhou 39.461 homens trabalhadores da área da saúde (Health Professionals Follow-up Study – HPFS). O critério de

doença periodontal era autorreportado (método validado em uma subamostra com exames radiográficos). Quanto ao consumo de álcool, foram classificados de acordo com a quantidade de álcool ingerida diariamente: 0,1 – 4,9 g por dia (0,1 – 122,5 ml de cerveja por dia), 5,0 – 14,9 g por dia (122,5 – 372,5 ml de cerveja por dia), 15,0 – 29,9 g por dia (372,5 – 747,5 ml de cerveja) e ≥ 30 g por dia ($\geq 747,5$ ml de cerveja). Os resultados mostram uma relação entre o consumo de álcool diário e o estabelecimento de doença periodontal (RR=1,24 - IC 95% 1,09-1,42, 1,18 - IC 95% 1,04-1,35, 1,18 - IC 95% 1,01-1,38 e 1,27 - IC 95% 1,08-1,49, respectivamente)²⁶. O segundo estudo, realizado no Japão, acompanhou 1.332 indivíduos também por quatro anos. O exame periodontal conduzido foi o CPI, e o critério para diagnóstico de doença foi de apresentar escores 3 e 4 no CPI (PS 4-5 mm e PS ≥ 6 mm, respectivamente). Quanto ao consumo de álcool, foram divididos em não consumidores, 0,1 – 20,0 g de álcool por dia (0,1 – 500 ml de cerveja por dia) e ≥ 20 g de álcool por dia (≥ 500 ml de cerveja por dia). Não foi encontrada associação entre o consumo de álcool e o estabelecimento de doença periodontal²⁷.

Além dos estudos de incidência de doença, existem também aqueles que avaliaram a progressão de doença. Na Suécia, 513 adultos (47% homens) foram acompanhados durante 20 anos (1970-1990). Indivíduos que apresentaram um elevado consumo de álcool (≥ 50 ml de álcool puro por dia – ≥ 1.050 ml de cerveja por dia) apresentaram maior número de superfícies cariadas ($p < 0,01$), maior quantidade de cálculo supragengival ($p=0,04$) e maior quantidade de lesões apicais ($p < 0,01$). Não foi encontrada relação entre consumo de álcool e progressão de doença periodontal destrutiva.

Na região metropolitana de Porto Alegre, 561 indivíduos (238 homens e 323 mulheres) com idades entre 19 e 65 anos foram acompanhados por um período de cinco anos (estudo de Porto Alegre). Para este levantamento, foram incluídos aqueles que não possuíam histórico de diabetes, nem outro problema sistêmico, e que tivessem no mínimo seis dentes naturais. Foi realizado exame periodontal completo e, para definição de progressão de doença periodontal, constatou-se a presença de no mínimo quatro dentes com aumento no NIC ≥ 3 mm. Os resultados mostram que, quanto maior o consumo de álcool, maior o risco para progressão de doença periodontal²⁸.

No Japão, 183 trabalhadores de uma fábrica foram acompanhados durante quatro anos. Foi realizado exame completo periodontal nesta população. O critério para progressão de

doença foi: apresentar acréscimo de 2 mm na PS de no mínimo dois dentes. Quanto ao consumo de álcool, foram dicotomizadas pessoas que consumiam uma quantidade menor do que 33 g de álcool por dia (< 700 ml de cerveja por dia) e igual ou maior do que 33 g de álcool por dia. O estudo mostra que indivíduos que consomem ≥ 33 g de álcool por dia possuem mais risco de ter progressão de doença (OR=3,54 - IC 95% 1,68-7,47), quando comparados aos que consomem < 33 g de álcool por dia²⁹.

Considerações Finais

Apesar da grande heterogeneidade apresentada nos estudos, a literatura mostra uma relação entre o consumo de álcool e as doenças periodontais, quer seja em estudos de caso-controle¹⁷⁻¹⁹, estudos transversais²⁰⁻²¹, estudos de incidência²⁶⁻²⁷ ou estudos de progressão de doença²⁸⁻³⁰. Quando se leva em consideração apenas a quantidade de álcool ingerida, o consumo de álcool está relacionado às doenças periodontais. Essa relação prioritariamente se dá com o consumo excessivo de álcool relacionando-se a piores quadros periodontais. Por outro lado, quando se avalia o consumo de álcool por tipo de bebida ingerida, o vinho tinto parece comportar-se como um fator de proteção para a perda de inserção periodontal²²⁻²³.

O grande problema na comparação dos resultados encontrados é devido aos diferentes métodos, tanto na aferição do consumo de álcool quanto nos exames periodontais e na definição de doença periodontal. Da mesma forma, os diferentes

mecanismos que a literatura tem demonstrado relativos ao consumo de baixas doses de álcool necessitam ser mais bem elucidados no que tange a relação entre álcool e doenças periodontais. Nesse sentido, até o presente, é importante que se tenha claro que o consumo excessivo de álcool tende a ser deletério ao periodonto. Entretanto, ainda há espaço de estudo sobre eventuais efeitos protetores do consumo de álcool em relação às doenças periodontais.

Sendo a Odontologia uma profissão da área da saúde, é importante que os profissionais estejam alertas a esta relação, incluam esse conhecimento nas entrevistas com seus pacientes e abordem os possíveis efeitos deletérios do consumo de álcool sobre o periodonto.

Nota de esclarecimento

Nós, os autores deste trabalho, não recebemos apoio financeiro para pesquisa dado por organizações que possam ter ganho ou perda com a publicação deste trabalho. Nós, ou os membros de nossas famílias, não recebemos honorários de consultoria ou fomos pagos como avaliadores por organizações que possam ter ganho ou perda com a publicação deste trabalho, não possuímos ações ou investimentos em organizações que também possam ter ganho ou perda com a publicação deste trabalho. Não recebemos honorários de apresentações vindos de organizações que com fins lucrativos possam ter ganho ou perda com a publicação deste trabalho, não estamos empregados pela entidade comercial que patrocinou o estudo e também não possuímos patentes ou *royalties*, nem trabalhamos como testemunha especializada, ou realizamos atividades para uma entidade com interesse financeiro nesta área.

Endereço para correspondência

Marcus Comparsi Wagner (Faculdade de Odontologia – UFRGS)

Rua Ramiro Barcelos, 2.492 – Santana

90035-003 – Porto Alegre – RS

Tel.: (51) 3308-5318

marciuscwagner@terra.com.br

REFERÊNCIAS

1. OMS. Global Status Report on Alcohol and Health. Geneva, Suécia: Organização Mundial da Saúde, 2011.
2. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1999;19(2):205-19.
3. Mukamal KJ, Chung H, Jenny NS, Kuller LH, Longstreth Jr. WT, Mittleman MA et al. Alcohol consumption and risk of coronary heart disease in older adults: the Cardiovascular Health Study. *J Am Geriatr Soc* 2006;54(1):30-7.
4. Meyerhoff DJ, Bode C, Nixon SJ, de Bruin EA, Bode JC, Seitz HK. Health risks of chronic moderate and heavy alcohol consumption: how much is too much? *Alcohol Clin Exp Res* 2005;29(7):1334-40.
5. Levels of consumption: Total adult per capita consumption by country. World Health Organization, 2013
6. Magrone T, Jirillo E. Polyphenols from red wine are potent modulators of innate and adaptive immune responsiveness. *Proc Nutr Soc* 2010;69(3):279-85.
7. Natella F, Macone A, Ramberti A, Forte M, Mattivi F, Matarese RM et al. Red wine prevents the postprandial increase in plasma cholesterol oxidation products: a pilot study. *Br J Nutr* 2011;1-6 (COMPLETE).
8. Leifert WR, Abeywardena MY. Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity. *Nutr Res* 2008;28(12):842-50.
9. Mannari C, Bertelli AA, Stiaccini G, Giovannini L. Wine, sirtuins and nephroprotection: not only resveratrol. *Med Hypotheses* 2010;75(6):636-8.
10. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):134-44.
11. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4(1):1-6.
12. Flemmig TF. Periodontitis. *Ann Periodontol* 1999;4(1):32-8.
13. Dalla Vecchia CF, Susin C, Rosing CK, Oppermann RV, Albandar JM. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *J Periodontol* 2005;76(10):1721-8.
14. Hyman JJ, Reid BC. Epidemiologic risk factors for periodontal attachment loss among adults in the United States. *J Clin Periodontol* 2003;30(3):230-7.
15. Chavarry NG, Vettore MV, Sansone C, Sheiham A. The relationship between diabetes mellitus and destructive periodontal disease: a meta-analysis. *Oral health & preventive dentistry* 2009;7(2):107-27.
16. Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol* 1999;34(6):830-41.
17. Amaral Cda S, Luiz RR, Leao AT. The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. *J Periodontol* 2008;79(6):993-8.
18. Amaral Cda S (VERIFICAR), da Silva-Boghossian CM, Leao AT, Colombo AP. Evaluation of the subgingival microbiota of alcoholic and non-alcoholic individuals. *J Dent* 2011;39(11):729-38.
19. Khocht A, Janal M, Schleifer S, Keller S. The influence of gingival margin recession on loss of clinical attachment in alcohol-dependent patients without medical disorders. *J Periodontol* 2003;74(4):485-93.
20. Nishida N, Tanaka M, Hayashi N, Nagata H, Takeshita T, Nakayama K et al. Association of ALDH2 genotypes and alcohol consumption with periodontitis. *J Dent Res* 2004;83(2):161-5.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol* 2001;72(2):183-9.
25. 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.
26. Pitiphat W, Merchant AT, Rimm EB, Joshipura KJ. Alcohol consumption increases periodontitis risk. *J Dent Res* 2003;82(7):509-13.
27. 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.
28. Wagner MC. O efeito do consumo de álcool sobre a progressão da perda de inserção periodontal: Estudo de Porto Alegre: UFRGS, 2008.
29. Nishida N, Tanaka M, Sekine S, Takeshita T, Nakayama K, Morimoto K et al. Association of ALDH2 genotypes with periodontitis progression. *J Dent Res* 2010;89(2):138-42.
30. Ogawa H, Yoshihara A, Hirotoji T, Ando Y, Miyazaki H. Risk factors for periodontal disease progression among elderly people. *J Clin Periodontol* 2002;29(7):592-7.

4.2. *Artigo 2*

“Effect of 15% alcohol dependence on alveolar bone loss and TNF- α secretion in Wistar rats”

Wagner, M.C.; Rocha, J.M.; Gaio, E.J.; Cavagni, J.; Carrard, V.C.; Rösing, C.K.

Artigo submetido ao periódico Brazilian Dental Journal em janeiro de 2015 e aguardando parecer dos revisores



Effect of 15% alcohol dependence on alveolar bone loss and TNF- α secretion in Wistar rats

Journal:	<i>Brazilian Dental Journal</i>
Manuscript ID:	BDJ-2015-0062
Manuscript Type:	Original Article
Keyword:	periodontitis , alveolar bone loss, rats, alcohol dependence

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Effect of 15% alcohol dependence on alveolar bone loss and TNF- α secretion in Wistar rats.

Short title: Alcohol dependence and alveolar bone loss

For Review Only

SUMMARY:

The aim of the present study was to evaluate the effect of 15% alcohol dependence on ligature-induced alveolar bone loss and TNF- α secretion in Wistar rats. Thirty-three male Wistar rats aged 45-60 days (mean weight = 253 g) were randomly allocated test or control groups. Test group (n = 18) received 15% alcohol as liquid intake and control group (n = 15) received water during the experimental period. TNF- α was analyzed by ELISA in 11 animals per group. After 14 days of alcohol/water intake, alcohol dependency was assessed and silk ligatures were placed around the left second upper molars. Ligature presence and body weight were checked weekly. After 40 days, animals were sacrificed and the maxillae defleshed for morphometric analysis in standardized pictures. All animals in the test group displayed signs of alcohol dependency at Day 14. No statistically significant differences in final body weight (334.83 ± 21.38 vs. 322.48 ± 30.65 grams, $P = 0.20$) were observed between groups. In relation to alveolar bone loss, no statistically significant difference was observed among test and control groups both for ligated teeth (0.76 ± 0.06 vs. 0.74 ± 0.10 mm, $P = 0.60$) and unligated teeth (0.41 ± 0.16 vs. 0.35 ± 0.05 mm, $P = 0.22$). The TNF- α secretion also did not display statistically significant differences between test and control groups (10.78 ± 1.84 vs. 12.13 ± 2.11 pg/mL, $P = 0.12$). It may be concluded that 15% alcohol dependency was not capable to alter alveolar bone loss and TNF- α secretion in Wistar rats.

KEY-WORDS: periodontitis, rats, alcohol dependence, alveolar bone loss

INTRODUCTION

The relationship between alcohol consumption and several chronic diseases has been reported as a U- or J-shaped curve attributed to a dose-related combination of beneficial and harmful effects. While alcoholism or alcohol abuse can lead to cardiovascular, liver and pancreatic diseases, light to moderate consumption of alcohol may display a protective effect (1,2,3). Several biological mechanisms can be involved in the pathogenesis or prevention of these chronic diseases, such as the modulation of some pro-inflammatory markers (e.g. IL-6 and TNF- α)(4,5). The drinking pattern can also impair or repair the immunological function by modulation of neutrophils, macrophages and T-cells (6,7).

Periodontal diseases have an infecto-inflammatory nature and are associated mainly to gram-negative bacteria (8,9). The relationship between alcohol consumption and periodontal diseases remains unclear in the literature. Similarly to the relationship with other chronic diseases, results from animal and human studies seem to report a U- or J-shaped curve (4,10). However, there is no sense in the literature about what pattern of alcohol consumption is considered safe, beneficial or harmful. Studies in rats with high alcohol concentration (20%) suggest that alcohol can have a destructive effect on the ligature-induced alveolar bone loss (11,12); on the other hand, low alcohol concentration (5%) seems to present a protective effect in spontaneous alveolar bone loss (13). Additionally, it has been demonstrated that moderate alcohol consumption is associated with lower levels of cytokines linked to periodontitis in humans (5).

Few studies have sought to clarify the relative role of alcohol dependence on periodontitis in humans and are scarce in animal models (14,15,16). Therefore, important questions remain regarding this issue. Among these, the role of alcohol dependence on pro-inflammatory cytokines and what is the concentration that could be attributed as beneficial or harmful to the periodontium. The aim of the present study is to evaluate the impact of alcohol consumption on the pathogenesis of periodontal diseases in rats. The hypothesis to be tested is that 15% alcohol dependence can alter both periodontal breakdown and TNF- α secretion in Wistar rats.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Thirty-five male Wistar rats aged 45–60 days with mean weight of 253 ± 19.86 g were used in the present study. Animals were housed in cages with five animals at a temperature range from 18 °C to 20 °C and a 12 h light and dark cycle. The Ethical Committee on Animals Use of the Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil approved the experimental protocol (protocol number 18979/10, September 14, 2010).

Sample size calculations

Sample size estimates were based on data from a previous study (11). A difference of 0.2 mm in alveolar bone loss was expected as significant. Considering alpha and beta errors of 0.05 and 0.10 respectively, a minimum number of 14 animals per group was considered necessary.

Experimental groups and procedures

Animals were randomly assigned to two groups stratified by weight. The control group (N = 15) was fed with a standard laboratory rat chow (Nuvilab CR1[®], Nuvital Nutrientes SA, Colombo, Brazil) and tap water *ad libitum* for 6 weeks. The test group (N = 20) received the same diet except for the water, which was replaced by a 15% ethylic alcohol solution (Vetec[®], Rio de Janeiro, Brazil) that was available *ad libitum* throughout the experiment. Prior to ligature placement, the test group was submitted to a 2-week period of 15% alcohol intake. Two animals of the test group were lost. The first died in the first week due to complications of alcohol intake and the second died in the day that the ligature was placed during the anesthesia. These deaths resulted in 15 animals for control and 18 animals for test group.

General anesthesia was performed by intramuscular administration of xylazine/ketamine (10 mg/kg – 1:1). Alveolar bone loss was induced by placement of 4.0 silk ligatures (Ethicon[®], Johnson & Johnson[®], São Paulo, Brazil) around the maxillary right second molars. The contra-lateral tooth remained as intra-group control (13,17). Animals were killed after 4 weeks of ligature placement. Figure 1 shows the flowchart of the study.

1
2
3 The liquid and solid intake was monitored during the study. Body weight and
4 presence of ligature of the animals were evaluated weekly.
5
6
7
8

9 Alcohol dependence test

10
11 Prior to periodontal breakdown induction, animals from test and control groups
12 were submitted to an alcohol dependence test (18,19). Animals were exposed to a 14 h
13 of alcohol/water abstinence. Following, they were removed from their cages and then
14 were gently manipulated and placed in another cage with minimum light and noise.
15 Physical signs of alcohol withdrawal were observed and recorded. Animals from control
16 group were used as negative controls. The examiner was unaware of the groups. The
17 signs observed were trembles in tail and body, jaw grind and hyperactivity.
18
19
20
21
22
23
24
25
26

27 TNF- α analysis

28
29 TNF- α analysis was performed in a randomly selected subgroup sample (11
30 animals per group). Animals were killed by decapitation and immediately trunk blood
31 collected and centrifuged for 5 minutes in 5000 x g at room temperature. The levels of
32 TNF- α in supernatants were determined using commercially available enzyme-linked
33 immunosorbent assay (ELISA) kit for rats TNF- α (Uscn Life Science Inc., Houston,
34 USA), according to manufacturer protocols. Samples were incubated on 96-well flat
35 bottom plates previously coated with anti-TNF- α antibody for 2 h at 37 °C. After this
36 first incubation, a TNF biotin-conjugated antibody preparation specific for TNF- α was
37 added to each well and incubated for 1 h and avidin-conjugated horseradish peroxidase
38 for 30 min at 37 °C. The reactions were stopped with 150 mL of 1.0 M H₂SO₄, and
39 ELISA reader measured the absorbencies at 490 nm. The standard TNF- α curve was
40 performed on each plate, ranging from 0 to 1.000 pg/mL. The tests were performed in
41 duplicate for each sample.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 Morphometric analysis

55
56
57
58
59
60

1
2
3 Following sacrifice, the right and left segments of the maxillae were defleshed in
4 sodium hypochlorite with 8.5% active chlorine (Mazzarollo[®], Gravataí, Brazil) for 5 h.
5 After rinsing, the specimens were washed and dried. After that, maxillae were stained
6 during 1 minute in 1% methylene blue (Quinta Essência, Porto Alegre, Brazil) to
7 delineate the cemento-enamel junction (13,17).
8
9
10

11
12 Standardized digital pictures were taken from the buccal, palatal and proximal
13 aspects of each specimen using a millimetric ruler and a Nikon D100 (Nikon[®],
14 Ayuthaia, Thailand) camera coupled in a tripod and equipped with a 100 mm macro-
15 lenses with minimal focal distance. Each specimen was placed with the occlusal surface
16 parallel to the floor. Linear measurements were performed with Adobe Photoshop CS4[®]
17 software (Adobe Systems Inc., San Jose, USA). Alveolar bone loss was defined as the
18 distance between the cemento-enamel junction and the alveolar bone crest. Buccal and
19 palatal measurements were made at five points (13,17). Following, in order to perform
20 proximal measurements, removal of the first and third molars was necessary. After these
21 procedures, measurements were made at three points in each proximal surface (20). For
22 each surface, mean values were calculated and, following, a mean value for the tooth
23 was generated.
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 The examiner was unaware of the group distribution as well as of the presence
34 or absence of ligature. Measurements were converted into millimeters, utilizing a
35 precision ruler as reference. Reproducibility was performed by re-analyzing the
36 specimens with a one-week interval. Intraclass Correlation Coefficient (ICC) was 0.96
37 and 0.89 for buccal/palatal and proximal surfaces, respectively.
38
39
40
41
42
43
44

45 Statistical analysis

46
47 For each evaluated parameter normality was tested by means of Shapiro–Wilk
48 analysis and the appropriate statistical test was selected according to this assumption.
49 The rat was considered the unit of analysis in this study. All tests were performed by
50 SPSS[®] version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Mean body weight throughout the
51 study was calculated and compared by repeated measurements ANOVA. Intragroup
52 mean body weight, alveolar bone loss and the TNF- α secretion were compared by
53 independent samples *t*-test.
54
55
56
57
58
59
60

RESULTS

At day 0, animals were tested for alcohol dependence. All animals from the test group demonstrated signs of alcohol dependence (trembles in tail and body, jaw grind and hyperactivity) whereas this characteristic was not detected in animals from control group.

The body weight of the animals was monitored throughout the study. Statistically significant differences in mean body weight were observed between control and test groups at days 7 ($P = 0.01$) and 28 ($P = 0.04$). During the entire study, higher values of body weight were observed in the control group (Figure 2). Body weight increased both in test and control groups, with statistically significant differences being detected by Repeated Measures ANOVA within each group along the study when compared to day -14 ($P < 0.00$).

During the experimental period, animals from the test group had a mean daily alcohol consumption of 21.69 milliliters. Figure 3 shows the evolution of alcohol consumption for test group from day 0 to day 28 (Repeated measures ANOVA). Animals from test group presented less daily alcohol consumption in day 14 ($P = 0.01$) and day 21 ($P = 0.03$) compared to day 0. At day 28, no differences were observed compared to day 0 ($P = 0.08$).

The main outcome of the present study is periodontal breakdown. Table 1 shows the mean alveolar bone loss in teeth with and without ligature in control and test groups. Data are demonstrated for each tooth surface and also combining all tooth surfaces. Statistically significant differences between groups were observed only in the distal aspect of teeth with ligatures ($P = 0.02$). It can be observed that teeth without ligature present approximately 40% less periodontal breakdown than teeth with ligatures.

TNF- α secretion analysis (mean \pm SD) showed no statistically significant differences between control and test group (12.13 ± 2.11 and 10.78 ± 1.84 pg/ml) respectively, ($P = 0.12$).

DISCUSSION

1
2
3 This study analyzed the influence of 15% alcohol dependence on alveolar bone
4 destruction and TNF- α secretion in male Wistar rats. No differences in the mean
5 alveolar bone loss were found in this study, when the whole tooth is considered.
6 Previously, studies showed that a low concentration of alcohol consumption (5%) had a
7 protective effect on spontaneous periodontitis (13). while a higher concentration of
8 alcohol consumption (20%) had a destructive effect on the periodontium (11). Similarly,
9 in epidemiologic studies, a moderate consumption of alcohol can have a protective
10 effect for periodontal disease while a heavy consumption is associated with a
11 destructive pattern (10). These evidences seem to confirm a U- or J-shaped curve
12 relationship between alcohol consumption and periodontal disease, similarly to what
13 happens in relationship with cardiovascular diseases and the consumption of alcohol. In
14 this sense, it would be interesting to determine the cut-off point of the curve in order to
15 better understand this relationship.
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 One interesting finding of the present study is that when surfaces are analyzed
26 separately, considering the distal aspects, a statistically significant difference was
27 detected among groups, demonstrating, for these surfaces, a protective effect of alcohol.
28 This is in line with other studies, and this result should not be ruled out. Therefore, a
29 potential protective effect was demonstrated in this study. The findings of the present
30 study seem mimic low/moderate alcohol consumption.
31
32
33
34
35

36 Low/moderate alcohol consumption has been considered a preventive factor by
37 reducing the risk for myocardial infarction, stroke and other systemic disorders.
38 However, high concentration of alcohol consumption confers a higher risk of
39 myocardial infarction. It is not clear which kind of beverage or what is the concentration
40 of alcohol that would have a preventive effect and why low/moderate regular alcohol
41 intake should be beneficial to humans (3,21). A drinking pattern of 3–4 times per week
42 has been found inversely associated with the risk of myocardial infarction in men (1).
43
44
45
46
47
48

49 Alcohol can have an anti-bacterial role, however the potential effect of regular
50 low/moderate alcohol intake on the oral microbiota has not been fully demonstrated.
51 Drinking patterns have been assessed and seem to alter the oral bacterial profile.
52 Consumption for at least two years of coffee or red wine is associated with a reduction
53 of the frequency of anaerobes in supra- and subgingival plaque samples compared to
54 water drinkers (22). Studies on alcohol dependence and alcohol consumption on
55
56
57
58
59
60

1
2
3 periodontal diseases are controversial. While some studies reveal increased risk with
4 increasing daily consumption of alcohol, other studies verified no association
5 (10,16,23). If alcohol consumption reduces the bacterial load in the oral cavity, this
6 effect would be observed on the prevalence of infectious diseases in the mouth.
7
8
9

10 Pathogenesis of periodontal breakdown has been widely studied in rat models.
11 Previous studies evaluated alveolar bone loss only in buccal and palatal surfaces
12 (11,13,17). In the present study a new approach was conducted in order to measure
13 proximal surfaces. Therefore, first and third molars were gently removed followed by
14 standardized pictures of the mesial and distal surfaces, allowing the same as the
15 measurements performed in buccal and palatal surfaces. It's important to emphasize that
16 a positive correlation between alveolar bone loss in buccal/palatal and proximal surfaces
17 has been shown, which improves the use of this new approach to quantify alveolar bone
18 loss in Wistar rats (20).
19
20
21
22
23
24
25

26 Several mechanisms have been suggested by which alcohol intake could lower
27 the risk of inflammatory diseases, such as beneficial effects on C-reactive protein, IL-6,
28 and TNF- α (5,24,25). The present study showed no differences in TNF- α levels between
29 groups, although there is a reduction of approximately 18% in production of TNF- α in
30 the test group. This mean percent reduction is very similar to human studies that found
31 significant results between groups exposed or not to alcohol (5,24).
32
33
34
35
36

37 Adverse effects of high consumption of alcohol on human health are well
38 known described in the literature. One possible explanation is that this seems to occur
39 because the episodic consumption of large amounts of alcohol has been associated with
40 increase of the host susceptibility to infections. This effect has biological plausibility to
41 clarify its influence on periodontal diseases, since the high consumption of alcohol can
42 cause damage in neutrophils, macrophages, and function of T cells, increasing the
43 likelihood of infections (6).
44
45
46
47
48

49 The findings of the present study are challenging, with possibilities of better
50 understanding the relationship between alcohol consumption and periodontal
51 breakdown. The possible biological mechanisms still need better comprehension, as
52 well as longitudinal follow-up is required. It can be concluded that 15% alcohol
53 consumption generated dependence, however was not able to consistently modify
54 alveolar bone loss and TNF- α secretion in male Wistar rats.
55
56
57
58
59
60

RESUMO EM PORTUGÊS:

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da dependência de álcool a 15% sobre a perda óssea alveolar induzida e secreção de TNF- α em ratos Wistar. Trinta e três ratos wistar com idade entre 45 e 60 dias (peso médio = 253 g) foram alocados aleatoriamente para o grupo teste ou controle. O grupo teste (n = 18) recebeu álcool a 15% como ingestão líquida e o grupo controle (n = 15) recebeu água durante o período experimental. TNF- α foi analisado por meio de ELISA em 11 animais por grupo. Após 14 dias de ingestão de álcool/água a dependência do álcool foi determinada e ligaduras de seda foram colocadas ao redor dos segundos molares superiores esquerdos. A presença das ligaduras e o peso corporal foram verificadas semanalmente. Depois de 40 dias os animais foram sacrificados e as maxilas foram preparadas para análise morfométrica em fotografias estandardizadas. Todos os animais do grupo teste apresentaram sinais de dependência de álcool no dia 14. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no peso corporal final entre os grupos (334.83 \pm 21.38 vs. 322.48 \pm 30.65 gramas, $P = 0.20$) Em relação a perda óssea alveolar, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos teste e controle tanto para dentes com (0.76 \pm 0.06 vs. 0.74 \pm 0.10 mm, $P = 0.60$) como para dentes sem ligadura (0.41 \pm 0.16 vs. 0.35 \pm 0.05 mm, $P = 0.22$). A secreção de TNF- α também não demonstrou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos teste e controle (10.78 \pm 1.84 vs. 12.13 \pm 2.11 pg/mL, $P = 0.12$). Pode-se concluir que a dependência de álcool a 15% não foi capaz de alterar a perda óssea alveolar e a secreção de TNF- α em ratos Wistar.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Marcelo Ekman Ribas for help us with during the experimental phase of this project.

REFERENCES

1. Mukamal KJ, Conigrave KM, Mittleman MA, Camargo Jr CA, Stampfer MJ, Willett WC, et al. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 2003;348:109-118.
2. Elkind MS, Sciacca R, Boden-Albala B, Rundek T, Paik MC, Sacco RL. Moderate alcohol consumption reduces risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. *Stroke* 2006;37:13-19.
3. Costanzo S, Di Castelnuovo A, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 2011;26:833-850.
4. 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:S50-53.
5. Marques-Vidal P, Bochud M, Bastardot F, von Kanel R, Ferrero F, Paccaud F, et al. Associations between alcohol consumption and selected cytokines in a Swiss population-based sample (CoLaus study). *Atherosclerosis* 2012;222:245-250.
6. Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol* 1999;34:830-841.
7. Romeo J, Wärnberg J, Nova E, Díaz LE, Gómez-Martínez S, Marcos A. Moderate alcohol consumption and the immune system: a review. *Br J Nutr* 2007;98 Suppl 1:S111-115.
8. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol.* 1998;25:134-144.
9. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005;38:135-187.
10. Bouchard P, Boutouyrie P, Mattout C, Bourgeois D. Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. *J Periodontol* 2006;77:479-489.

- 1
2
3 11. Souza DM, Ricardo LH, Prado MA, Prado FA, Rocha RF. The effect of alcohol
4 consumption on periodontal bone support in experimental periodontitis in rats. *J*
5 *Appl Oral Sci* 2006;14:443-447.
6
7
- 8
9 12. Souza DM, Ricardo LH, Kantorski KZ, Rocha RF. Influence of alcohol
10 consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in
11 rats. *Braz Oral Res* 2009;23:326-332.
12
13
- 14 13. Liberman DN, Pilau RM, Gaio EJ, Orlandini LF, Rosing CK. Low concentration
15 alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. *Arch Oral*
16 *Biol* 2011;56:109-113.
17
18
- 19
20 14. Enberg N, Wolf J, Ainamo A, Alho H, Heinala P, Lenander-Lumikari M. Dental
21 diseases and loss of teeth in a group of Finnish alcoholics: a radiological study. *Acta*
22 *Odontol Scand* 2001;59:341-347.
23
24
- 25
26 15. Amaral CS, Luiz RR, Leão AT. The relationship between alcohol dependence and
27 periodontal disease. *J Periodontol* 2008;79:993-998.
28
29
- 30 16. Amaral CS, Vettore MV, Leão A. The relationship of alcohol dependence and
31 alcohol consumption with periodontitis: a systematic review. *J Dent* 2009;37:643-
32 651.
33
34
- 35
36 17. Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosing CK. Comparison of
37 histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced
38 periodontitis in rats. *Braz Oral Res* 2007;21:216-221.
39
40
- 41
42 18. Majchrowicz E. Reversal in central neural system function during ethanol
43 withdrawal in humans and experimental animals. *Fed Proc* 1981;40:2065-2072.
44
45
- 46 19. Chung CS, Wang J, Wehman M, Rhoads DE. Severity of alcohol withdrawal
47 symptoms depends on developmental stage of Long-Evans rats. *Pharmacol Biochem*
48 *Behav* 2008;89:137-144.
49
50
- 51
52 20. Azambuja CB, Cavagni J, Wagner MC, Gaio EJ, Rosing CK. Correlation analysis of
53 alveolar bone loss in buccal/palatal and proximal surfaces in rats. *Braz Oral Res*
54 2012;26:571-577.
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 21. Di Castelnuovo A, Rotondo S, Iacoviello L, Donati MB, De Gaetano G. Meta-
4 analysis of wine and beer consumption in relation to vascular risk. *Circulation*
5 2002;105:2836–2844.
6
7
8
9 22. Signoretto C, Bianchi F, Bulacchini G, Sivieri F, Spratt D, Canepari P. Drinking
10 habits are associated with changes in the dental plaque microbial community. *J Clin*
11 *Microbiol.* 2010;48: 347–356.
12
13
14 23. Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. Alcohol consumption and periodontal
15 disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin*
16 *Periodontol* 2004;31:484–488.
17
18
19
20 24. Pai JK, Hankinson SE, Thadhani R, Rifai N, Pischon T, Rimm EB. Moderate
21 alcohol consumption and lower levels of inflammatory markers in US men and
22 women. *Atherosclerosis* 2006;186:113–120.
23
24
25
26 25. Imhof A, Froehlich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W. Effect of
27 alcohol consumption on systemic markers of inflammation. *Lancet* 2001;357:763–
28 767.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1: Mean alveolar bone loss (mm (\pm SD)) in teeth with and without ligatures in control and test groups.

Group	Teeth with ligature				
	Mesial	Distal	Palatal	Buccal	Total
Control	0.86 (\pm 0.15)	0.81 (\pm 0.10)	0.69 (\pm 0.13)	0.89 (\pm 0.15)	0.76 (\pm 0.06)
Test	0.89 (\pm 0.16)	0.69 (\pm 0.16)	0.69 (\pm 0.12)	0.84 (\pm 0.20)	0.74 (\pm 0.10)
<i>P</i> *	0.58	0.02	0.96	0.44	0.60
Group	Teeth without ligature				
	Mesial	Distal	Palatal	Buccal	Total
Control	0.50 (\pm 0.16)	0.49 (\pm 0.56)	0.46 (\pm 0.10)	0.29 (\pm 0.05)	0.41 (\pm 0.16)
Test	0.48 (\pm 0.12)	0.31 (\pm 0.12)	0.42 (\pm 0.04)	0.26 (\pm 0.03)	0.35 (\pm 0.05)
<i>P</i> *	0.80	0.19	0.17	0.10	0.22

*Independent samples *t*-test

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

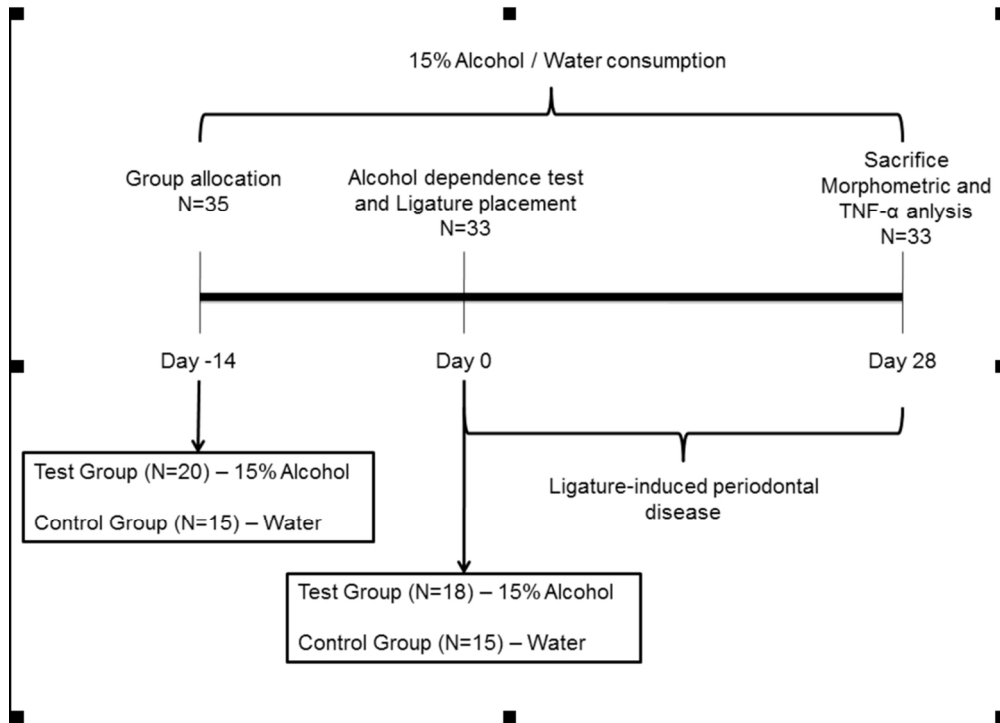
Figure captions

Figure 1. Study flowchart.

Figure 2. Mean body weight (grams) for control and test groups throughout the study.
*Independent samples *t*-test ($P < 0.05$).

Figure 3. Mean daily alcohol consumption (milliliters) per animal in the test group from day 0 to 28.

For Review Only

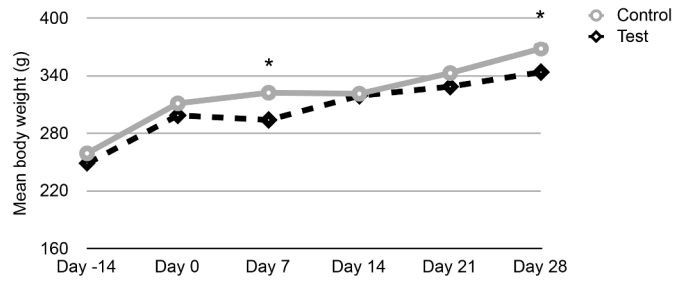


100x72mm (300 x 300 DPI)

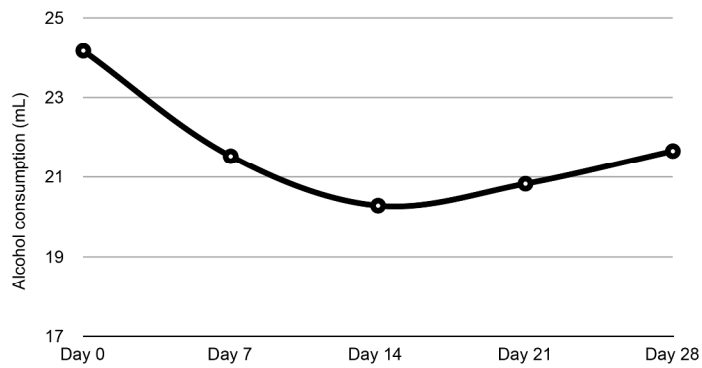
www.Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



209x297mm (300 x 300 DPI)



209x297mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

4.3. *Artigo 3*

“Red wine consumption decreases the occurrence of spontaneous periodontitis and TNF- α levels in Wistar rats”

Wagner, M.C.; Cavagni, J.; Gaio, E.J.; Soster, V.; Brum, V.; Jesus, L.H.; Sant’anna Filho, M.; Carrard, V.C.; Dorneles, G.P.; Peres, A.; Rösing, C.K.

Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Archives of Oral Biology

Red Wine consumption decreases the occurrence of spontaneous periodontitis and TNF- α levels in Wistar rats

Marcus Comparsi Wagner^{a,*}

Juliano Cavagni^a

Eduardo José Gaio^a

Vagner Soster^a

Vanessa dos Santos Brum^a

Luciano Henrique de Jesus^a

Manoel Sant'Ana Filho^b

Vinicius Coelho Carrard^b

Gilson Pires Dorneles^c

Alessandra Peres^c

Cassiano Kuchenbecker Rösing^a

^aDepartment of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^bDepartment of Oral Pathology, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^cHealth Basic Science Department, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

***Corresponding Author:**

Marcus Comparsi Wagner

Rua Joaquim Caetano, 700 / 802A

Canoas/RS, Brazil

ZIP Code: 90220-410

Phone: +55 51 32110322

Phone Fax: +55 51 32110322

Mobile: + 55 51 99067962

Email: marciuswagner@terra.com.br

Running title: Red wine and periodontal breakdown in rats.

Abstract

Objective: to evaluate the influence of red wine consumption, alcohol, grape juice and resveratrol in the occurrence of spontaneous and ligature induced periodontitis as well as TNF α and IL-6 levels in Wistar rats.

Methods: 50 male Wistar rats were randomly assigned to 5 groups (Control, Red Wine, Grape Juice, 12% Alcohol and 0.04-0.05mg/mL Resveratrol). All groups were fed with laboratory rat chow and solutions according to each group. After 8 weeks, a ligature was placed around the maxillary right second molars. The contra-lateral molars remained as controls. After 14 days, all animals were killed and blood samples collected and specimens prepared for morphometric analysis. A cut-off point in the 75th percentile in the side without ligature was used for definition of spontaneous periodontitis. Body weight, food, liquid and calories intake were monitored weekly.

Results: all animals completed the experiment. No differences were observed in body weight between groups throughout the study. Significant differences were found in food and liquid intake between control and other groups ($p < 0.01$) and for calories intake for grape juice and alcohol 12% compared to Control ($p < 0.01$). According to mean alveolar bone loss, no statistically significant differences were found both in sides with ligature and without ligature. Animals which consumed red wine presented a lower occurrence of spontaneous periodontitis compared to the other groups and lower levels of TNF- α (0.97 ng/mL) compared to controls (1.97 ng/mL, $p = 0.008$).

Conclusion: Red wine consumption decreases the occurrence of spontaneous periodontitis and TNF- α levels in Wistar rats.

Keywords: wine, resveratrol, alcohol consumption, Wistar rats, periodontitis, tumor necrosis factor - α .

Introduction

Alcohol consumption represents a major health problem, resulting in approximately 2.5 millions of deaths in the world according to the World Health Organization (1). Studies demonstrate that heavy alcohol consumption ($\geq 40\text{g/day}$ for men and $\geq 20\text{g/day}$ for women) (2) can lead to liver complications, cardiovascular diseases and behavioral handicap (3-5). Not only the amount of alcohol consumed, but also the type of alcoholic beverage may alter the response. Moderate consumption of red wine is known to have a protective effect in chronic diseases such cardiovascular, ischemic, circulatory, blindness and periodontitis (6-12). Moreover, red wine consumption may lower the amount of plaque attached to tooth surfaces supra and subgingivally (13) due to substances such as polyphenols which display anti-adhesive properties against *Streptococcus mutans*, as well as inhibition of substances involved in synthesis of an adherent, water-insoluble glucan from sucrose which evolves to dental biofilm (14).

The potential benefits observed from exposure to red wine are not completely understood in the literature. The anti-inflammatory potential might be either related to the presence of alcohol or to other substances in the composition of the wine. Resveratrol is one of the supposed beneficial substances present in wine. It has been demonstrated that resveratrol is an important antioxidant, anti-inflammatory, cardioprotector (15) and assists in the obesity loss and metabolic diseases associated to aging process (16). It also has a potential to decrease the formation of viable colonies of *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) and *Porphyromonas gingivalis* (Pg) *in vitro* (17). Resveratrol reduces the expression of nitric oxid, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 and TNF- α in the damaged tissue induced by Pg (18).

Animal studies are important to better understand the causal chain of periodontal diseases and, in this respect, the literature shows that lower concentration of alcohol protects against spontaneous alveolar bone loss (19, 20); on the other hand, increases in alcohol concentration seems to potentialize both induced (21, 22) and spontaneous alveolar bone loss (23, 24). In addition, high concentrations of alcohol consumption seems to increase the levels of

TNF- α (25) and of the inflammatory signs in otherwise healthy gingiva (23). To the best of our knowledge, animal models have been used only testing the amount and concentration of alcohol consumed, but not a specific beverage.

Taking into consideration the positive effects of red wine consumption in humans and the lack of studies in animal model, the aim of this study was to evaluate the influence of red wine consumption, alcohol consumption at 12% (same as red wine), grape juice and resveratrol (a polyphenol found in Red Wine and Grape Juice) in the occurrence of spontaneous and ligature induced periodontitis in Wistar rats and TNF- α and IL-6 levels. The hypothesis to be tested is that the combination of different substances in red wine rather than each one isolated is responsible for the beneficial effects.

Materials and Methods

Ethical considerations

The present study was approved by Institutional Review Boards both of the Federal University of Rio Grande do Sul (number 26632) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (project number 14/0335). This study was funded by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Sample size calculation

In order to estimate the sample size, a difference of 0.7mm between groups submitted to alcohol at 10% and 20% in a previous study was utilized (22). Considering alpha and beta errors of 0.05 and 0.10 respectively, 8 animals per group were necessary. Considering a possible attrition rate of 20% (26), soon 10 animals per group were used.

Animals

Fifty male Wistar rats, 45 days old and a mean body weight of 308.75g (\pm 25.26g) were randomly assigned to 5 groups of 10 animals each stratified by weight, by means of draw: Control (water), Red Wine, Grape Juice,

12% Alcohol (same concentration of red wine) and 0.04-0.05mg/L Resveratrol (the same concentration of the red wine). The Control group was fed with a standard laboratory rat chow and tap water *ad libitum*. Test groups received the same standard diet but the water was replaced with the respective solutions Red wine (Almaden[®] Cabernet Sauvignon, Bento Gonçalves, Brazil), Grape Juice (Sunny Days[®], Bento Gonçalves, Brazil), 12% Alcohol (Vetec[®], Rio de Janeiro, Brazil) and 0.04-0.05 mg/L Resveratrol (Equilibrium Pharmacy[®], Porto Alegre, Brazil). Solutions and food intake were spontaneous and *ad libitum*. Animals were housed in boxes of 5 animals each in a controlled environment (temperature 22°C ± 2°C and dark/light cycle of 12 hours) during whole experimental period. Food and liquid intake were measured daily and body weight measured once a week. Figure 1 shows the study flowchart.

Spontaneous and ligature-induced alveolar bone loss

Prior to ligature placement all specimens were exposed to the respective liquid regimen (water, red wine, grape juice, alcohol at 12% and resveratrol) during 56 days.

General anesthesia was obtained by inhalation of Isoflurane in all animals. In both groups, alveolar bone loss was induced by placement of 4-0 cotton ligatures (Ethicon[®], Johnson & Johnson[®], São Paulo, Brazil) around the maxillary right second molars. The contra-lateral tooth remained as intra-group control (19, 26-28) and used for the analysis of spontaneous periodontitis. After 14 days of the ligature placement, animals were sacrificed, blood samples collected and specimens prepared for morphometric analysis.

Morphometric analysis

Following sacrifice, the right and the left segments of the maxillae were defleshed in sodium hypochlorite with 9% active chlorine (Mazzarollo[®], Gravataí, Brazil) for 2 hours. After rinsing, the specimens were stained with methylene blue 1% (Quinta Essência, Porto Alegre, Brazil) to delineate the cement-enamel junction (19, 27, 28).

Standardized digital pictures were taken from the buccal and palatal aspects of each specimen using a millimetric ruler and a Nikon D5100[®] camera

coupled with medical lenses and minimal focal distance. Each specimen was placed with the occlusal surface parallel to the floor. Linear measurements were performed with Adobe Photoshop CS6® (Adobe Systems Software Ireland Ltd). These measurements resulted in a pixel value, which was converted into millimeters. Periodontal bone loss was defined as the distance between the cement-enamel junction (CEJ) 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 (Fig. 2).

The examiner was unaware of the group distribution as well as of the ligature presence or absence. A trained and calibrated examiner performed all the measurements. Prior to measurements, calibration was performed by double measurement of randomly chosen pictures (n=20) with one-week interval. The intra-class correlation coefficient (ICC) between measurements was 0.99. During the experiment a new calibration was performed with 10% of the sample and the ICC between measurements was also 0.99.

For definition of spontaneous periodontitis, a cut-off point was established, in order to define the occurrence of destruction. An analysis of data from the contra-lateral tooth (without ligature) was performed and the 75th percentile was considered the cut-off point (20). Thus, teeth that presented a mean alveolar bone loss $\geq 0.39\text{mm}$ were considered as having spontaneous periodontitis.

TNF- α and IL-6 analysis

TNF- α and IL-6 were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using serum samples (Mini ELISA Development Kit, 900-M21, PeproTech Inc, New Jersey, USA). The intra-assay coefficient of variation was <7.5% for all cytokines. Briefly, plates of 96 wells were incubated overnight with capture antibody anti-IL-6 or TNF- α diluted in 1x PBS buffer. After blocking for 1 hour to avoid non-specific binding, 100 μL of standard IL-6 or TNF- α and serum samples were placed. The cytokines were detected by horseradish peroxidase-labeled monoclonal antibody to each target after addition of 100 μL anti-human IL-6 or TNF- α biotinylated antibodies were placed in each well and incubated for 2 hours at room temperature. The microplate was washed to

remove unbound enzyme-labeled antibodies. The amount of horseradish peroxidase bound to each well was determined by the addition of 100 μ L substrate solution. The reaction was stopped by the addition of 100 μ l of 1 M sulfuric acid, and the plates were read at 405 nm (ThermoPlate, São Paulo, Brazil). The concentrations of cytokines were determined by interpolation from standard curve and presented as pg/mL, and converted into ng/mL.

Statistical analysis

Shapiro-Wilk test for normality was used and a normal distribution was detected in all continuous variables. Means and standard deviations were calculated and intergroup analyses were performed by ANOVA followed by Bonferroni. All analyses were performed using IBM SPSS Statistics 20.0 for Windows.

Results

All animals completed the experimental protocol. The body weight throughout the study is show in Figure 3. No statistically significant differences were observed in body weight between groups during the study.

Table 1 summarizes the mean daily food (g), liquid (mL) and calories (cal) intake per animal. For both food and liquid consumption, statistically significant differences were observed between control and all the test groups ($p < 0.01$). Animals exposed to red wine and 12% alcohol had a lower daily liquid intake ($22.78\text{mL} \pm 1.07$ and $23.44\text{mL} \pm 0.42$) compared to control ($32.51\text{mL} \pm 1.91$) ($p < 0.01$); and those exposed to grape juice and resveratrol had a higher daily liquid intake ($38.17\text{mL} \pm 1.44$ and $38.50\text{mL} \pm 1.14$) also compared to control ($p < 0.01$). Groups exposed to red wine, grape juice and 12% alcohol showed lower food intake ($19.05\text{g} \pm 0.34$, $19.55\text{g} \pm 0.42$ and $19.43\text{g} \pm 0.17$), when compared to control ($p < 0.01$). In respect to daily calories intake, grape juice and 12% alcohol demonstrated higher and lower calories intake ($84.41\text{cal} \pm 2.27$ and $72.09\text{cal} \pm 0.83$) compared to control group ($74.46\text{cal} \pm 1.77$) with $p < 0.01$.

Table 2 shows the average alveolar bone loss (mm \pm SD) for all groups. No statistically significant differences were observed between groups both in sides with and without ligature.

Figure 4 demonstrates the occurrence of periodontitis according to the established cut-off point. In sides without ligature, animals which consumed red wine, presented a lower occurrence of periodontitis compared to the other groups (Red Wine: 1 case; Control, 12% Alcohol and 0.04-0.05mg/mL Resveratrol: 2 cases; Grape Juice: 6 cases). Table 3 demonstrates the cytokine profile obtained after sacrifice. For IL-6, no statistically significant differences were observed between groups, however animals which consumed red wine presented lower levels of TNF- α (0.97ng/mL \pm 0.49) compared to control group (1.97ng/mL \pm 1.06) ($p = 0.008$).

Discussion

The objective of this study was to evaluate the influence of red wine consumption, alcohol consumption at 12%, grape juice and resveratrol in the occurrence of spontaneous and ligature induced periodontitis as well as TNF- α and IL-6 levels in Wistar rats. The main results demonstrated that rats, which consumed red wine, had lower levels of TNF- α and a lower occurrence of spontaneous periodontitis compared to the other groups.

The hypothesis behind the study was that the consumption of red wine could be one protective factor for the occurrence of periodontal breakdown. This hypothesis rises from the studies demonstrating the anti-inflammatory properties of red wine, as well as the benefits it seems to cause in non-communicable chronic diseases (6-8, 10, 29). In fact, the actual mechanisms by which red wine benefits in such cases has not been completely understood. Some studies infer that the presence of alcohol in such concentration is responsible for the outcomes and others report that components of the red wine, such as polyphenols are the main source of benefit (15, 16, 30-32).

The present study follows a line of research by our group, in which we previously demonstrated in animals that alcohol in low/moderate concentrations could decrease spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats (19, 20). The experimental groups include the main objective of test (red wine), as well as three groups which have parts of the composition of the red wine: grape juice, alcohol and resveratrol. The comparison of these groups with a control group should allow for the understanding if and what part of the components of red wine would be beneficial for periodontal tissues.

The main results of the present study are in line with those found in humans where red wine consumption had a protective effect over periodontal tissues (11, 12, 33) and decreased levels of inflammatory markers such TNF- α (18, 34). The understanding of the present study should be contextualized in terms of its methodological characteristics. The methodology applied for the present study includes all contemporary research principles for animal studies, including randomization, blindness, comparison and sample size calculation. This increases the validity of the results, allowing for the highest degree of translation, within the limitations of rat studies for periodontal diseases (35).

For experimental periodontitis, rats have been used due to some similarities with human such as anatomical, immunological and microbiological characteristics. In addition, rat studies have demonstrated the occurrence of both spontaneous and induced alveolar bone loss, with shifts in the periodontal microbiota and concomitant increase in inflammatory markers (35). To the best of our knowledge, this was the first study in the literature which used a specific alcoholic beverage in an animal model for spontaneous and ligature-induced alveolar bone loss. In addition, red wine was chosen due to the fact that it is an alcoholic beverage with mild alcohol concentration, as compared to beer (low concentration) and distilled beverages (high concentration).

The published literature has used the red wine components (alcohol, resveratrol, red grape juice) isolated in studies for other diseases with varying concentrations (9, 29, 30, 36-40). For example, it seems that there is a relationship between the amount and concentration of alcohol consumed and the severity of disease. This has been referred as a J-shaped curve and it has

been extensively studied for hypertension (41, 42). Lower concentrations of alcohol (5%) represent a protective effect on spontaneous alveolar bone loss (19); on the other hand, higher concentrations ($\geq 20\%$) represent a risk factor both for ligature-induced (21, 22, 25) as well as spontaneous alveolar bone loss (23, 24).

The fact that higher concentrations of alcohol intake represent a risk may be explained because alcohol decreases neutrophil function (43) and increases production of pro-inflammatory cytokines such IL-1, IL-6 and TNF- α (44), and the presence of these markers in gingiva is associated with periodontitis (45).

When rats that have a chronic alcohol intake are submitted to resveratrol, the side effects of alcohol (weight loss, hepatotoxicity, anti-oxidant agents) decreases and there is an improvement of general health of these animals (38). Resveratrol also decreases TNF- α expression (34) and IL-17 in rats submitted to alveolar bone loss induced by ligature (46). Despite of the positive results of the compounds isolated, interestingly we demonstrated that only the combination of the components (red wine) was capable of reducing the occurrence of spontaneous periodontitis and TNF- α levels in an animal model.

It is important to consider that the differences could be detected in the present study are restricted to spontaneous alveolar bone loss. This has also been the case in other studies (19, 20). A possible explanation for this fact is that when a ligature is placed in order to induce periodontal breakdown, this agent may promote an acute inflammation which is not equivalent to the human process (47). Also, the challenge represented by the ligature could be of such magnitude that it could mask subtle effects. In order to evaluate the side without ligature, our research group has used the concept of spontaneous periodontitis where a cut-off point in the 75th percentile of the distribution is used. Animals which present losses above this point are considered as cases of spontaneous periodontitis (20, 48).

In the present study, differences among groups could not be detected with the mean values. This could be explained by a regression towards the mean, as well as that, contemporarily other forms of analysis have

been used, in addition to averages. Studies have used this model of analyzing the occurrence of periodontal breakdown with this cut-off point in the 75th percentile of the control group (20, 48). This allows for the understanding of the highest impacting effects, since in the simple mean analysis, the ones with no impact are considered together. Instead of using one site for statistical analysis, we used the tooth for analysis. In such an analysis, a clear impact of red wine consumption was detected in the occurrence of a more impacting alveolar bone loss. This outcome should be compared with the concomitant pattern of cytokines, in order to see if there is a possible explanation.

In the present study, red wine consumption decreased TNF- α levels in the serum, demonstrating a possible anti-inflammatory effect. The levels of interleukin-6 were did not reach a statistically significant difference. However, TNF- α is clearly a marker associated with periodontal breakdown in different studies (25, 49, 50). The fact that no statistically significant differences had been observed in IL-6 in the serum, does not mean that there are not in the periodontal site, which was not object of evaluation in the present study. Rats are animals which an immune system with a significant adaptive capacity.

The results of the present study also support the epidemiological data in which moderate alcohol consumption seems to have a beneficial effect in males (11, 12). High consumption, on the other hand, is demonstrated to be detrimental (51, 52). The information from such studies should be included both in preventive as well as in therapeutic approaches. This is a challenge, since alcohol consumption should never be incentivated to a level that alcoholism is present. The literature is still controversial in this respect and despite of the positive results both in human and animal models, additional studies are needed to explain the mechanisms of red wine and its components in the development or inhibition of periodontitis.

In conclusion, red wine consumption decreases TNF- α levels and is a protective factor for the occurrence of spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats.

Acknowledgement

The authors would like to thank to Animal Experimentation Unit staff for all support and Miolo Wine Group (Bento Gonçalves, Brazil) which provided the Red Wine and the Grape Juice used in this study.

References

1. OMS. Global Status Report on Alcohol and Health. Geneva, Suécia: Organização Mundial da Saúde; 2011.
2. OMS. International Guide for Monitoring Alcohol Consumption and Related Harm; 2000.
3. Mukamal KJ, Chung H, Jenny NS, Kuller LH, Longstreth WT, Jr., Mittleman MA, et al. Alcohol consumption and risk of coronary heart disease in older adults: the Cardiovascular Health Study. *J Am Geriatr Soc* 2006;**54**(1):30-37.
4. Meyerhoff DJ, Bode C, Nixon SJ, de Bruin EA, Bode JC, Seitz HK. Health risks of chronic moderate and heavy alcohol consumption: how much is too much? *Alcohol Clin Exp Res* 2005;**29**(7):1334-1340.
5. McClain CJ, Barve S, Deaciuc I, Kugelmas M, Hill D. Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin Liver Dis* 1999;**19**(2):205-219.
6. Leifert WR, Abeywardena MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols. *Nutr Res* 2008;**28**(11):729-737.
7. Mannari C, Bertelli AA, Stiacchini G, Giovannini L. Wine, sirtuins and nephroprotection: not only resveratrol. *Med Hypotheses* 2010;**75**(6):636-638.
8. Sheu SJ, Liu NC, Chen JL. Resveratrol protects human retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced damage. *J Ocul Pharmacol Ther* 2010;**26**(3):231-236.
9. Natella F, Macone A, Ramberti A, Forte M, Mattivi F, Matarese RM, et al. Red wine prevents the postprandial increase in plasma cholesterol oxidation products: a pilot study. *Br J Nutr* 2011:1-6.
10. Magrone T, Jirillo E. Polyphenols from red wine are potent modulators of innate and adaptive immune responsiveness. *Proc Nutr Soc* 2010;**69**(3):279-285.
11. Kongstad J, Hvidtfeldt UA, Gronbaek M, Jontell M, Stoltze K, Holmstrup P. Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen City Heart Study. *J Clin Periodontol* 2008;**35**(12):1032-1039.
12. Susin C, Wagner MC, Haas AN, Oppermann RV, Albandar JM. The association between alcohol consumption and periodontitis in southern Brazilian adults. *J Periodontol Res* 2014.
13. Signoretto C, Bianchi F, Burlacchini G, Sivieri F, Spratt D, Canepari P. Drinking habits are associated with changes in the dental plaque microbial community. *J Clin Microbiol* 2010;**48**(2):347-356.
14. Signoretto C, Burlacchini G, Bianchi F, Cavalleri G, Canepari P. Differences in microbiological composition of saliva and dental plaque in subjects with different drinking habits. *New Microbiol* 2006;**29**(4):293-302.
15. Lin JF, Lin SM, Chih CL, Nien MW, Su HH, Hu BR, et al. Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats. *Life Sci* 2008;**83**(9-10):313-317.
16. Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006;**444**(7117):337-342.
17. O'Connor DJ, Wong RW, Rabie AB. Resveratrol inhibits periodontal pathogens in vitro. *Phytother Res* 2011;**25**(11):1727-1731.
18. Antonietta R, Nazario B, Luigi G, Marco A, Caterina RC, Rossella P. Effect of resveratrol and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells. *Cytokine* 2012;**60**:197-204.

19. Liberman DN, Pilau RM, Gaio EJ, Orlandini LF, Rösing CK. Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. *Arch Oral Biol* 2011;**56**(2):109-113.
20. Oballe HJ, Gaio EJ, Spuldaro T, Cavagni J, Gomez R, Rösing CK. Effects of alcohol and/or tobacco exposure on spontaneous alveolar bone loss in rat. *Braz Dent J* 2014;**25**(3):197-202.
21. de Souza DM, Ricardo LH, Prado MeA, Prado FeA, da Rocha RF. The effect of alcohol consumption on periodontal bone support in experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci* 2006;**14**(6):443-447.
22. 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):326-332.
23. Surkin PN, Ossola C, Mohn CE, Elverdin JC, Fernández-Solari J. Chronic alcohol consumption alters periodontal health in rats. *Alcohol Clin Exp Res* 2014;**38**(7):2001-2007.
24. Bannach SV, Teixeira FB, Fernandes LM, Ferreira RO, Santana LN, Fontes-Júnior EA, et al. Alveolar bone loss induced by chronic ethanol consumption from adolescence to adulthood in Wistar rats. *Indian J Exp Biol* 2015;**53**(2):93-97.
25. 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):456-460.
26. 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.
27. 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):130-134.
28. 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):94-98.
29. Leifert WR, Abeywardena MY. Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity. *Nutr Res* 2008;**28**(12):842-850.
30. Coimbra SR, Lage SH, Brandizzi L, Yoshida V, da Luz PL. The action of red wine and purple grape juice on vascular reactivity is independent of plasma lipids in hypercholesterolemic patients. *Braz J Med Biol Res* 2005;**38**(9):1339-1347.
31. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* 2012;**23**(2):174-181.
32. Davalos A, de la Pena G, Sanchez-Martin CC, Teresa Guerra M, Bartolome B, Lasuncion MA. Effects of red grape juice polyphenols in NADPH oxidase subunit expression in human neutrophils and mononuclear blood cells. *Br J Nutr* 2009;**102**(8):1125-1135.
33. Bouchard P, Boutouyrie P, Mattout C, Bourgeois D. Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. *J Periodontol* 2006;**77**(3):479-489.
34. Wang W, Yan C, Zhang J, Lin R, Lin Q, Yang L, et al. SIRT1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis of vascular adventitial fibroblasts partly through the deacetylation of FoxO1. *Apoptosis* 2013;**18**(6):689-701.
35. Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 1991;**62**(1):59-73.
36. Elkind MS, Sciacca R, Boden-Albala B, Rundek T, Paik MC, Sacco RL. Moderate alcohol consumption reduces risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. *Stroke* 2006;**37**(1):13-19.
37. Anselm E, Chataigneau M, Ndiaye M, Chataigneau T, Schini-Kerth VB. Grape juice causes endothelium-dependent relaxation via a redox-sensitive Src- and Akt-dependent activation of eNOS. *Cardiovasc Res* 2007;**73**(2):404-413.
38. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, El May M, Gharbi N, et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci* 2007;**80**(11):1033-1039.

39. Wu JM, Hsieh TC. Resveratrol: a cardioprotective substance. *Ann N Y Acad Sci* 2011;**1215**:16-21.
40. Jacobs DM, Fuhrmann JC, van Dorsten FA, Rein D, Peters S, van Velzen EJ, et al. Impact of short-term intake of red wine and grape polyphenol extract on the human metabolome. *J Agric Food Chem* 2012;**60**(12):3078-3085.
41. Moreira DM, Poffo MR, Miotto R, Matos SeM, Ferreira AR, de Abreu-Silva EO. Revisiting the J-curve phenomenon. An old new concept? *Curr Hypertens Rev* 2014;**10**(1):14-19.
42. Tanna MS, Bangalore S. Antihypertensive therapy and the J-curve: fact or fiction? *Curr Hypertens Rep* 2015;**17**(2):6.
43. Patel M, Keshavarzian A, Kottapalli V, Badie B, Winship D, Fields JZ. Human neutrophil functions are inhibited in vitro by clinically relevant ethanol concentrations. *Alcohol Clin Exp Res* 1996;**20**(2):275-283.
44. Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol* 1999;**34**(6):830-841.
45. Offenbacher S. Periodontal diseases: pathogenesis. *Ann Periodontol* 1996;**1**(1):821-878.
46. Casati MZ, Algayer C, Cardoso da Cruz G, Ribeiro FV, Casarin RC, Pimentel SP, et al. Resveratrol Decreases Periodontal Breakdown and Modulate Local Levels of Cytokines During Periodontitis in Rats. *J Periodontol* 2013.
47. Li CH, Amar S. Morphometric, histomorphometric, and microcomputed tomographic analysis of periodontal inflammatory lesions in a murine model. *J Periodontol* 2007;**78**(6):1120-1128.
48. Cavagni J, Wagner TP, Gaio EJ, Rêgo RO, Torres IL, Rösing CK. Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats. *Arch Oral Biol* 2013;**58**(8):1034-1039.
49. Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S. Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res* 2015;**2015**:615486.
50. da Costa TA, Silva MJ, Alves PM, Chica JE, Barcelos EZ, Giani MA, et al. Inflammation Biomarkers of Advanced Disease in Nongingival Tissues of Chronic Periodontitis Patients. *Mediators Inflamm* 2015;**2015**:983782.
51. 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):484-488.
52. Pitiphat W, Merchant AT, Rimm EB, Joshipura KJ. Alcohol consumption increases periodontitis risk. *J Dent Res* 2003;**82**(7):509-513.

Figure Captions

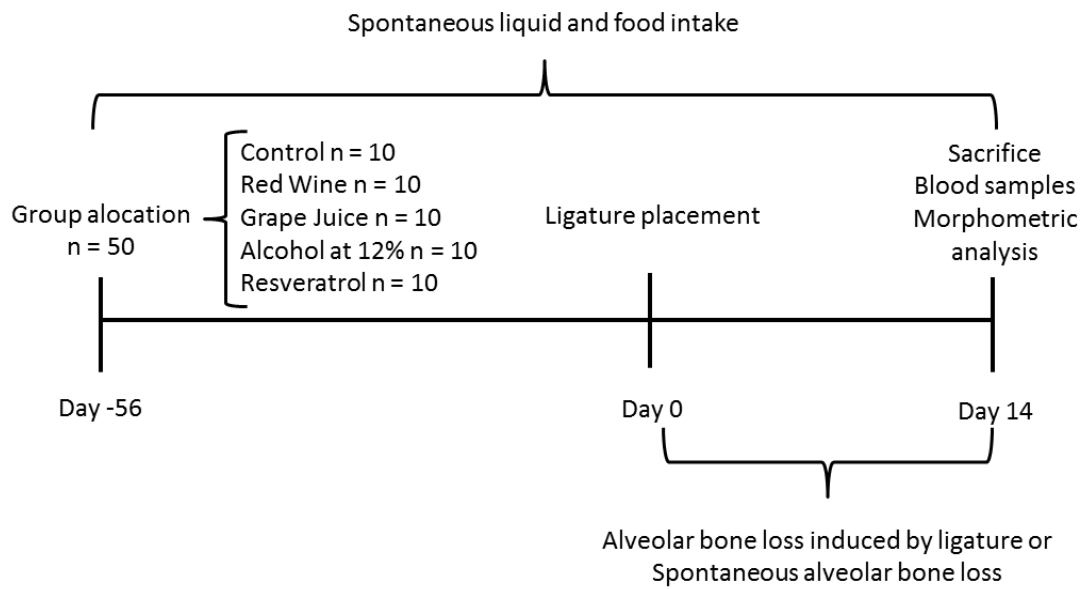


Figure 1: Study flowchart

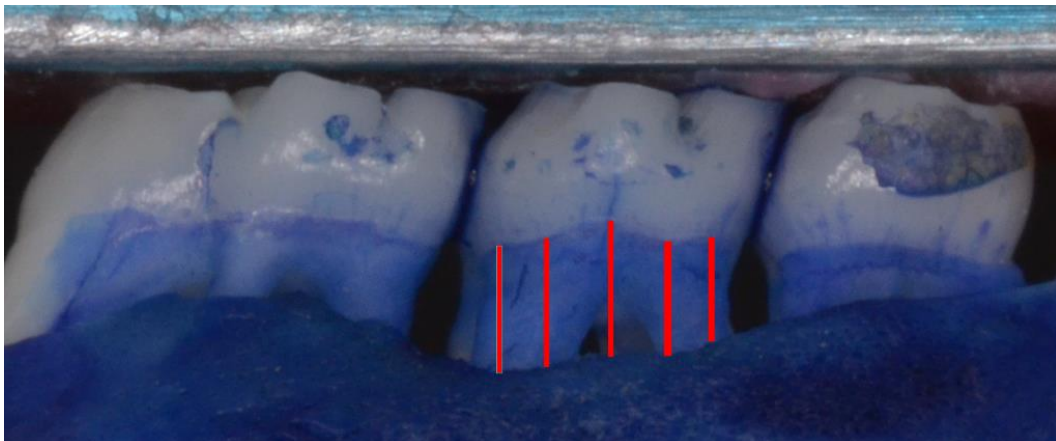


Figure 2: Alveolar bone loss measurement

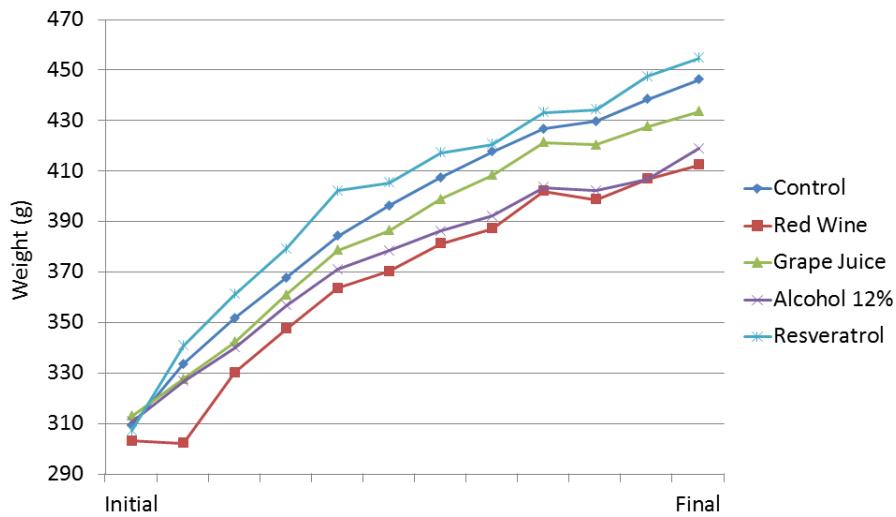


Figure 3: Mean body weight (g) throughout study. No statistically differences were observed between groups along the study (ANOVA, $p > 0.05$).

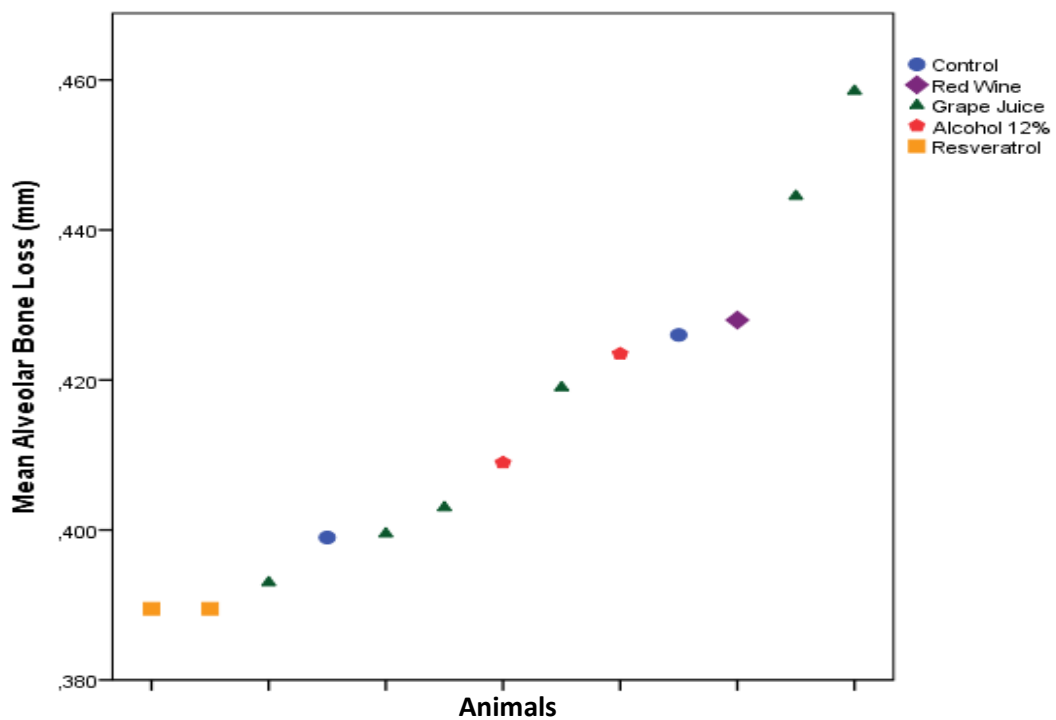


Figure 4: distribution of spontaneous cases of periodontitis according to study groups

Tables

Table 1: Mean daily liquid (mL), food (g) and calories intake (cal) for each animal cage;

	Control	Red Wine	Grape Juice	Alcohol 12%	Resveratrol	P
Liquid	32.51 (\pm 1.91)	22.78 (\pm 1.07)*	38.17 (\pm 1.44)*	23.44 (\pm 0.42)*	38.50 (\pm 1.14)*	< 0.01
Food	25.24 (\pm 0.60)	19.05 (\pm 0.24)*	19.55 (\pm 0.42)*	19.43 (\pm 0.17)*	25.83 (\pm 0.24)*	< 0.01
Calories	74.46 (\pm 1.77)	73.74 (\pm 1.54)	84.41 (\pm 2.27)*	72.09 (\pm 0.83)*	76.18 (\pm 0.70)	< 0.01

* Significant difference compared to control group

Table 2: Mean alveolar bone loss (mm, \pm SD) in teeth with and without ligature according the experimental group.

	Control	Red Wine	Grape Juice	Alcohol 12%	Resveratrol	p*
With ligature	0.60 (\pm 0.07)	0.59 (\pm 0.04)	0.64 (\pm 0.10)	0.59 (\pm 0.09)	0.67 (\pm 0.08)	0.12
Without ligature	0.36 (\pm 0.04)	0.35 (\pm 0.04)	0.39 (\pm 0.05)	0.35 (\pm 0.04)	0.36 (\pm 0.03)	0.17

*ANOVA

Table 3: Levels of IL-6 and TNF- α (mean \pm SD in ng/mL) according to test groups.

	Control	Red Wine	Grape Juice	Alcohol 12%	Resveratrol	P
IL-6	0.77 (\pm 0.38)	0.66 (\pm 0.28)	0.54 (\pm 0.23)	0.97 (\pm 0.47)	0.67 (\pm 0.20)	0.06
TNF-α	1.97 (\pm 1.06)	0.97* (\pm 0.49)	1.63 (\pm 0.38)	2.05 (\pm 0.57)	1.72 (\pm 0.30)	0.008*

* Significant difference compared to control group

5. Considerações finais

Álcool é uma droga lícita que pode causar dependência e é responsável por cerca de 2,5 milhões de morte anualmente no globo (OMS, 2011). Por ser consumido em padrões diferentes [no Brasil a bebida mais consumida é a cerveja, enquanto que na Argentina e no Uruguai é o vinho, por exemplo (OMS, 2013)] e quantidades diferentes, além da disponibilidade no organismo também ser diferente, uma mesma quantidade de álcool pode representar um fator de risco ou proteção dependendo da pessoa. Por isso, estudos ainda são necessários para o real entendimento dos mecanismos do álcool no organismo.

A relação entre o consumo de álcool e as doenças periodontais tem sido estudada desde a década de 60. Dois estudos de caso-controle utilizaram pacientes com cirrose hepática e foram observadas piores condições periodontais nestes pacientes comparados a pacientes saudáveis (Sandler e Stahl, 1960; Movin, 1981). Porém, em virtude dos métodos de diagnóstico usados na época, e, da falta do real entendimento da ação do álcool sobre o organismo, esta relação encontrada fora atribuída a questões comportamentais, onde o indivíduo, sobre o efeito do álcool, não escovava os dentes e, portanto, tinha maior quantidade e severidade de doença periodontal comparados a outros indivíduos. Tendo este pressuposto, o estudo da relação entre consumo de álcool e doenças periodontais fora deixado de lado até os anos 2000.

A literatura mostra que o consumo excessivo de álcool (OMS, 2000) pode levar a complicações no fígado (McClain *et al.*, 1999), problemas cardiovasculares (Mukamal *et al.*, 2006) e comportamentais (Meyerhoff *et al.*, 2005), além de alterar a expressão de alguns marcadores pró-inflamatórios como IL-6 e TNF- α (McClain *et al.*, 1999) e prejudicar a função de neutrófilos, macrófagos e células T, aumentando deste modo a probabilidade de ocorrência de infecções (Szabo, 1999). Problemas na quimiotaxia e fagocitose de neutrófilos, assim como a presença de mediadores inflamatórios (IL-6 e TNF- α) no fluido crevicular gengival têm sido associados às periodontites (Hart, Shapira e Van Dyke, 1994; Van Dyke e Vaikuntam, 1994; Offenbacher, 1996). Através desta possível inferência de que o álcool modula negativamente a

resposta do organismo, aumentando o risco às periodontites, novos estudos, tanto em animais quanto em humanos foram conduzidos.

Poucos artigos na literatura abordam a questão da dependência química de álcool e doença periodontal e são estudos apenas em humanos (Enberg *et al.*, 2001; Amaral *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2011; Lages *et al.*, 2015). Estes trabalhos mostram uma relação estatisticamente significativa entre piores índices gengivais (nível de inserção clínica, profundidade de sondagem e microbiota) e alcoolismo.

Quanto a estudos animais, este trabalho teve o ineditismo de ver a relação entre a dependência química de álcool a 15% e perda óssea alveolar. O modelo para dependência química e aferição da mesma, apesar de ser datado da década de 80 é usado até os dias atuais por ser um modelo de fácil aplicação e reprodução (Movin, 1981). Todos os animais que foram submetidos à indução da dependência química, apresentaram sinais de dependência 15 dias após (desorientação, tremores no corpo e ranger de dentes). Neste estudo, apesar de comprovada a dependência química de álcool, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo dependente químico de álcool a 15% e o grupo controle que não fez consumo de álcool, tanto nos níveis de TNF- α quanto na perda óssea alveolar induzida e espontânea. Uma possível explicação para o fato da não-ocorrência da diferença significativa pode estar na moderada concentração de álcool oferecida (15%), tendo em vista que, quando são oferecidas concentrações de álcool superiores a 20% é demonstrado uma correlação positiva entre consumo de álcool e perda óssea alveolar (Irie *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2009), enquanto que, para concentrações inferiores a 10% esta correlação se inverte, passando a ter um efeito protetor (Lieberman *et al.*, 2011).

Este foi o primeiro estudo em modelo animal que não somente avaliou o teor alcóolico, como também um tipo de bebida consumida (no caso o vinho). Similarmente a resultados encontrados em humanos (Bouchard *et al.*, 2006; Kongstad, Hvidtfeldt, Gronbaek, *et al.*, 2008; Susin *et al.*, 2014), o consumo de vinho está associado com menor ocorrência de doença periodontal destrutiva.

A hipótese por trás deste estudo é a de que o consumo de vinho tinto poderia ser um fator de proteção para as doenças periodontais, tendo em vista suas propriedades anti-inflamatórias e seus benefícios para doenças crônico-

degenerativas como doenças cardiovasculares (Leifert e Abeywardena, 2008b), doenças isquêmicas (Mannari *et al.*, 2010), acidente vascular cerebral (Elkind *et al.*, 2006), melhorias na resposta do sistema imune inato e adaptativo (Magrone e Jirillo, 2010), assim como doença periodontal em humanos (Bouchard *et al.*, 2006; Kongstad *et al.*, 2008; Susin *et al.*, 2014). Tendo em vista que muitas “melhorias” atribuídas ao consumo do vinho poderiam ser devidas aos componentes nele envolvidos como o resveratrol (Baur *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008), além do vinho tinto, foram analisados os efeitos do consumo do suco de uva, álcool a 12% e do resveratrol (componentes do vinho tinto). Neste estudo foi demonstrado que, apesar dos resultados encontrados na literatura para os componentes de forma isolada, apenas os componentes unidos, sob a forma de vinho tinto, foram capazes de reduzir a ocorrência de periodontite espontânea e níveis de TNF- α .

Para este estudo, todos os princípios contemporâneos para pesquisa em animais foram seguidos (randomização, cegamento, cálculo amostral, grupos de comparação), o que aumenta a validade dos resultados, permitindo maior extrapolação dos resultados para humanos, respeitando as limitações dos estudos com ratos para doenças periodontais (Klausen, 1991).

É importante ressaltar também que, além de utilizar simplesmente a quantidade de perda óssea alveolar, este trabalho segue também uma nova linha de definição de doença periodontal para ratos, a qual foi atribuída como periodontite espontânea, se baseando na distribuição da perda óssea no lado sem ligadura conforme estudo prévio de linha de pesquisa desenvolvida no grupo (Cavagni *et al.*, 2013; Oballe *et al.*, 2014). Animais que estão acima do percentil 75 desta distribuição são considerados como casos de periodontite espontânea.

Apesar dos resultados positivos encontrados tanto neste estudo quanto na literatura, o consumo de álcool não deve ser incentivado devido aos malefícios que ele representa para a saúde (fenômeno da curva J). Como a literatura ainda apresenta resultados conflitantes, mais estudos são necessários para o real entendimento dos mecanismos da ação do álcool sobre os tecidos periodontais.

Finalizando, por não existirem ensaios clínicos em humanos (todos os estudos até o momento são observacionais), estudos com esta metodologia

para o entendimento dos efeitos da suspensão do consumo de álcool sobre os tecidos periodontais ou sobre a terapêutica periodontal são necessários.

Por enquanto, para o clínico geral, é importante que perguntas relacionadas ao consumo de bebidas alcoólicas sejam incorporadas para uma melhor compreensão e entendimento da doença que o paciente possui, lembrando que o hábito de beber não deve ser estimulado devido aos seus malefícios e que estes dados de consumo de álcool sirvam de apoio para planejamento de políticas de saúde pública visando o bem-estar da população.

6. Referências bibliográficas

- Albandar, J. M.; Brunelle, J. A.; Kingman, A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. **J Periodontol**, v. 70, n. 1, p. 13-29, Jan 1999.
- Amaral, S. et al. Evaluation of the subgingival microbiota of alcoholic and non-alcoholic individuals. **J Dent**, v. 39, n. 11, p. 729-38, Nov 2011.
- Amaral, S.; Luiz, R. R.; Leao, A. T. The relationship between alcohol dependence and periodontal disease. **J Periodontol**, v. 79, n. 6, p. 993-8, Jun 2008.
- Antonietta, R. et al. Effect of resveratrol and modulation of cytokine production on human periodontal ligament cells. **Cytokine**, v. 60, p. 197-204, 2012.
- Armitage, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 1-6, Dec 1999.
- Bannach, S. V. et al. Alveolar bone loss induced by chronic ethanol consumption from adolescence to adulthood in Wistar rats. **Indian J Exp Biol**, v. 53, n. 2, p. 93-7, Feb 2015.
- Baur, J. A. et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 337-42, Nov 16 2006.
- Bouchard, P. et al. Risk assessment for severe clinical attachment loss in an adult population. **J Periodontol**, v. 77, n. 3, p. 479-89, Mar 2006.
- Cavagni, J. et al. Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats. **Arch Oral Bio**, v. 58, n. 8, p. 1034-39, 2013.
- Casati, M. Z. et al. Resveratrol Decreases Periodontal Breakdown and Modulate Local Levels of Cytokines During Periodontitis in Rats. **J Periodontol**, Mar 14 2013.
- Coimbra, S. R. et al. The action of red wine and purple grape juice on vascular reactivity is independent of plasma lipids in hypercholesterolemic patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1339-1347, 2005.
- Cruickshank, J. M. Coronary flow reserve and the J curve relation between diastolic blood pressure and myocardial infarction. **BMJ**, v. 297, n. 6658, p. 1227-30, Nov 1988.
- Cushnie, T. P. et al. Aggregation of Staphylococcus aureus following treatment with the antibacterial flavonol galangin. **J Appl Microbiol**, v. 103, n. 5, p. 1562-7, Nov 2007.
- Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Curr Opin Biotechnol**, v. 23, n. 2, p. 174-81, Apr 2012.
- Dantas, A. M. et al. Ethanol consumption enhances periodontal inflammatory markers in rats. **Arch Oral Biol**, v. 57, n. 9, p. 1211-7, Sep 2012.
- Davalos, A. et al. Effects of grape red juice polyphenols in NADPH oxidase subunit expression in human neutrophils and mononuclear blood cells. **British Journal of Nutrition**, v. 102, p. 1125-1135, 2009.
- Elkind, M. S. et al. Moderate alcohol consumption reduces risk of ischemic stroke: the Northern Manhattan Study. **Stroke**, v. 37, n. 1, p. 13-9, Jan 2006.

- Enberg, N. et al. Dental diseases and loss of teeth in a group of Finnish alcoholics: a radiological study. **Acta Odontol Scand**, v. 59, n. 6, p. 341-7, Dec 2001.
- Flemmig, T. F. Periodontitis. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 32-8, Dec 1999.
- Gonçalves, M. C. et al. Organic grape juice intake improves functional capillary density and postocclusive reactive hyperemia in triathletes. **Clinics**, v. 66, p. 1537-1541, 2011.
- Hach, M. et al. The effect of alcohol consumption on periodontitis in older Danes. **Int J Dent Hyg**, Feb 2015.
- Harikumar, K. B.; Aggarwal, B. B. Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. **Cell Cycle**, v. 7, n. 8, p. 1020-35, Apr 15 2008.
- Hart, T. C.; Shapira, L.; Van Dyke, T. E. Neutrophil defects as risk factors for periodontal diseases. **J Periodontol**, v. 65, n. 5 Suppl, p. 521-9, May 1994.
- Heegaard, K. et al. Amount and type of alcohol consumption and missing teeth among community-dwelling older adults: findings from the Copenhagen Oral Health Senior study. **J Public Health Dent**, v. 71, n. 4, p. 318-26, Fall 2011.
- Hertog, M. G.; Kromhout, D.; Aravanis, C. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, p. 381-386, 1995.
- Hussain, T. et al. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate selectively inhibits COX-2 without affecting COX-1 expression in human prostate carcinoma cells. **Int J Cancer**, v. 113, n. 4, p. 660-9, Feb 10 2005.
- Irie, K. et al. Effects of ethanol consumption on periodontal inflammation in rats. **J Dent Res**, v. 87, n. 5, p. 456-60, May 2008.
- Jang, M. et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v. 275, n. 5297, p. 218-20, Jan 10 1997.
- Kasdallah-Grissa, A. et al. Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. **Life Sci**, v. 80, n. 11, p. 1033-9, Feb 20 2007.
- Khocht, A. et al. The influence of gingival margin recession on loss of clinical attachment in alcohol-dependent patients without medical disorders. **J Periodontol**, v. 74, n. 4, p. 485-93, Apr 2003.
- Klausen, B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. **J Periodontol**, v. 62, n. 1, p. 59-73, Jan 1991.
- Kongstad, J. et al. Amount and type of alcohol and periodontitis in the Copenhagen City Heart Study. **J Clin Periodontol**, v. 35, n. 12, p. 1032-9, Dec 2008.
- Lages, E. J. et al. Alcohol Consumption and Periodontitis: Quantification of Periodontal Pathogens and Cytokines. **J Periodontol**, p. 1-14, Jun 2015.
- Lagouge, M. et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. **Cell**, v. 127, n. 6, p. 1109-22, Dec 15 2006.
- Lee, Y. M. et al. The role of sirtuin 1 in osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. **J Periodontal Res**, v. 46, n. 6, p. 712-21, Dec 2011.

Leifert, W. R.; Abeywardena, M. Y. Cardioprotective actions of grape polyphenols. **Nutrition Research**, v. 28, p. 729-737, 2008a.

_____. Grape seed and red wine polyphenol extracts inhibit cellular cholesterol uptake, cell proliferation, and 5-lipoxygenase activity. **Nutr Res**, v. 28, n. 12, p. 842-50, Dec 2008b.

Liberman, D. N. et al. Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 2, p. 109-13, Feb 2011.

Lin, J. F. et al. Resveratrol reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial ischemia in rats. **Life Sci**, v. 83, n. 9-10, p. 313-7, Aug 29 2008.

Magrone, T.; Jirillo, E. Antioxidants and the immune system Polyphenols from red wine are potent modulators of innate and adaptative immune responsiveness. **Proceedings of Nutrition Society**, v. 69, p. 279-285, 2010.

Mannari, C. et al. Wine, sirtuins and nephroprotection: Not only resveratrol. **Medical Hypotheses**, v. 75, p. 636-638, 2010.

Mariotti, A. Dental plaque-induced gingival diseases. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 7-19, Dec 1999.

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

Meyerhoff, D. J. et al. Health risks of chronic moderate and heavy alcohol consumption: how much is too much? **Alcohol Clin Exp Res**, v. 29, n. 7, p. 1334-40, Jul 2005.

Michan, S.; Sinclair, D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. **Biochem J**, v. 404, n. 1, p. 1-13, May 15 2007.

Movin, S. Relationship between periodontal disease and cirrhosis of the liver in humans. **J Clin Periodontol**, v. 8, n. 6, p. 450-8, Dec 1981.

Mukamal, K. J. et al. Alcohol consumption and risk of coronary heart disease in older adults: the Cardiovascular Health Study. **J Am Geriatr Soc**, v. 54, n. 1, p. 30-7, Jan 2006.

Naasani, I. et al. Blocking telomerase by dietary polyphenols is a major mechanism for limiting the growth of human cancer cells in vitro and in vivo. **Cancer Res**, v. 63, n. 4, p. 824-30, Feb 15 2003.

Natella, F. et al. Red wine prevents the postprandial increase in plasma cholesterol oxidation products: a pilot study. **British Journal of Nutrition**, v. 2011, p. 1-6, 2011.

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

_____. Association of ALDH2 genotypes with periodontitis progression. **J Dent Res**, v. 89, n. 2, p. 138-42, Feb 2010.

O'Connor, D. J.; Wong, R. W.; Rabie, A. B. Resveratrol inhibits periodontal pathogens in vitro. **Phytother Res**, v. 25, n. 11, p. 1727-31, Nov 2011.

O'Leary, K. A. et al. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. **Mutat Res**, v. 551, n. 1-2, p. 245-54, Jul 13 2004.

Oballe, H. J. et al. Effects of alcohol and/or tobacco exposure on spontaneous alveolar bone loss in rat. **Braz Dent J**, v. 25, n. 3, p. 197-202, 2014.

Offenbacher, S. Periodontal diseases: pathogenesis. **Ann Periodontol**, v. 1, n. 1, p. 821-78, Nov 1996.

Organização Mundial da Saúde. **International Guide for Monitoring Alcohol Consumption and Related Harm**. p.209. 2000

_____. **Global Status Report on Alcohol and Health**.p.81. 2011

_____. **Levels of consumption: Total adult per capita consumption by country**.2013.

Pai, J. K. et al. Moderate alcohol consumption and lower levels of inflammatory markers in US men and women. **Atherosclerosis**, v. 186, n. 1, p. 113-20, May 2006.

Park, J. B. et al. Association between alcohol consumption and periodontal disease: the 2008 to 2010 Korea National Health and Nutrition Examination Survey. **J Periodontol**, v. 85, n. 11, p. 1521-8, Nov 2014.

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

Sadik, C. D.; Sies, H.; Schewe, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. **Biochem Pharmacol**, v. 65, n. 5, p. 773-81, Mar 1 2003.

Saleem, T. S. M.; Basha, S. D. Red wine: A drink to your heart. **Journal of Cardiovascular Disease Research**, v. 1, n. 4, p. 171-176, 2010.

Sandler, H. C.; Stahl, S. S. Prevalence of periodontal disease in a hospitalized population. **J Dent Res**, v. 39, p. 439-49, May-Jun 1960.

Schewe, T. et al. Polyphenols of cocoa: inhibition of mammalian 15-lipoxygenase. **Biol Chem**, v. 382, n. 12, p. 1687-96, Dec 2001.

Sheu, S. J.; Liu, N. C.; Chen, J. L. Resveratrol protects human retinal pigment epithelial cells from acrolein-induced damage. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 231-237, 2010.

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

Signoretto, C. et al. Drinking habits are associated with changes in the dental plaque microbial community. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 2, p. 347-56, Feb 2010.

_____. Differences in microbiological composition of saliva and dental plaque in subjects with different drinking habits. **New Microbiol**, v. 29, n. 4, p. 293-302, Oct 2006.

Socransky, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J Clin Periodontol**, v. 25, n. 2, p. 134-44, Feb 1998.

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

_____. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. **Braz Oral Res**, v. 23, n. 3, p. 326-32, Jul-Sep 2009.

Surkin, P. N. et al. Chronic alcohol consumption alters periodontal health in rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 38, n. 7, p. 2001-7, Jul 2014.

Susin, C. et al. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of demographic, behavioral, and environmental risk indicators. **J Periodontol**, v. 75, n. 7, p. 1033-41, Jul 2004.

_____. The association between alcohol consumption and periodontitis in southern Brazilian adults. **J Periodontal Res**, Nov 2014.

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

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

Tanna, M. S.; Bangalore, S. Antihypertensive therapy and the J-curve: fact or fiction? **Curr Hypertens Rep**, v. 17, n. 2, p. 6, Feb 2015. ISSN 1534-3111.

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

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

Van Dyke, T. E.; Vaikuntam, J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. **Curr Opin Periodontol**, p. 19-27, 1994.

Wagner, M. C. et al. **Effect of 15% alcohol dependence on alveolar bone loss and TNF- α secretion in Wistar rats**: Federal University of Rio Grande do Sul 2013.

Wang, W. et al. SIRT1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis of vascular adventitial fibroblasts partly through the deacetylation of FoxO1. **Apoptosis**, v. 18, n. 6, p. 689-701, Jun 2013.

Wu, J. M.; Hsieh, T. C. Resveratrol: a cardioprotective substance. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1215, p. 16-21, Jan 2011.

Yamamoto, H.; Schoonjans, K.; Auwerx, J. Sirtuin functions in health and disease. **Mol Endocrinol**, v. 21, n. 8, p. 1745-55, Aug 2007.

Zern, T. L. et al. Grape polyphenols exert a cardioprotective effect in pre- and postmenopausal women by lowering plasma lipids and reducing oxidative stress. **J Nutr**, v. 135, n. 8, p. 1911-7, Aug 2005.