



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Karem Paula Pinto

Efeitos do consumo de álcool e nicotina no desenvolvimento da periodontite apical em ratos

Rio de Janeiro

2020

Karem Paula Pinto

Efeitos do consumo de álcool e nicotina no desenvolvimento da periodontite apical em ratos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Orientadores: Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva
Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone

Rio de Janeiro

2020

P659 Pinto, Karem Paula.
Efeitos do consumo de álcool e nicotina no desenvolvimento da periodontite apical em ratos / Karem Paula Pinto. – 2020.
70 f.

Orientadores: Emmanuel João Nogueira Leal da Silva, Luciana Moura Sassone.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Etanol - Efeitos adversos 2. Nicotina - Efeitos adversos. 3. Periodontite periapical - Etiologia. 4. Modelos animais de doenças. 5. Ratos Wistar. 6. Microtomografia por raio-X. I. Silva, Emmanuel João Nogueira Leal da. II. Sassone, Luciana Moura. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU
616.314

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Data

Karem Paula Pinto

Efeitos do consumo de álcool e nicotina no desenvolvimento da periodontite apical em ratos

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2020.

Orientadores:

Prof. Dr. Emmanuel João Nogueira Leal da Silva
Faculdade de Odontologia – UERJ
Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone
Faculdade de Odontologia – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Tauby de Souza Coutinho Filho
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Henrique Eduardo Oliveira
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Mário José Romãnach Gonzalez Sobrinho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

Aos meus pais, por nunca medirem esforços em prol dos meus estudos, e por todo o apoio para que eu possa alcançar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida que me proporciona. Agradeço pela saúde, pela força para superar os momentos difíceis e por iluminar o meu caminho.

À minha família, pela motivação, pelos valores transmitidos e por sempre acreditar em mim. Por conviver com a distância durante toda a minha formação acadêmica, sempre me apoiando nos momentos importantes da minha vida. Em especial:

À minha irmã, Kíssila, por sempre me encorajar a seguir os meus sonhos.

Aos meus pais, que sempre se esforçaram muito para que eu tivesse oportunidades que eles não puderam ter, e por toda a dedicação na minha educação. Amo vocês!

Aos meus amigos de longa data, especialmente à Sabrina, melhor amiga de vida, com quem sempre divido minhas alegrias, conquistas, dúvidas e decepções. Tenho mais uma etapa a comemorar com vocês.

Aos grandes amigos de faculdade, com os quais sei que sempre poderei contar. Nos tornamos uma família que será para toda a vida. Agradeço por podermos compartilhar nossas alegrias e vitórias, nos apoiando sempre.

Aos colegas de curso, tanto do mestrado quanto do doutorado, Ana Flávia, Carla, Miguel, Carol, Cláudio e Milena, pela alegria de todo dia, pelas conversas descontraídas, por toda a ajuda e por tornarem esse momento de aprendizado muito mais fácil.

Agradeço aos meus professores de graduação da UFF, pelos quais tive a sorte de ser orientada nas clínicas de endodontia: Prof. Dr. Henrique Oliveira, Prof.^a Patrícia Lana e Prof. Dr. Gustavo De-Deus. Se escolhi seguir o caminho da endo, devo à vocês todo o incentivo!

À todos os professores do Curso de Especialização em Endodontia da UERJ, pelos valiosos conhecimentos transferidos da melhor forma possível. Ao coordenador do curso, Prof. Dr. Tauby Coutinho, pela oportunidade de poder aprender endodontia com essa equipe maravilhosa. À Prof.^a Dr.^a Natasha, Prof.^a Nancy e Prof.^a Tatiana: a minha formação não teria sido a mesma sem vocês. E um agradecimento mais que especial a dois professores que sempre me apoiaram e me fizeram ter a certeza da minha escolha:

Ao Prof. Cláudio Malizia, que se tornou um grande amigo de curso. Agradeço a sorte de tê-lo junto a este projeto de pesquisa, por todo o auxílio, paciência, atenção e pelo exemplo de pessoa e profissional que você é.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emmanuel Silva, pela confiança, por todos os ensinamentos, disponibilidade e dedicação. Por todas as críticas e cobranças que me fizeram evoluir. É um privilégio poder aprender com você. Tenho uma enorme admiração por ti, e sempre será para mim uma grande inspiração para trilhar este caminho.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Luciana Sassone, por todo o incentivo, encorajamento, aprendizado e suporte, e também por todo o esforço e dedicação como coordenadora da Pós-graduação, em fazer este curso cada vez melhor.

Também agradeço aos dois, Emmanuel e Luciana, por todas as caronas na travessia Niterói-Rio de Janeiro, pelas inúmeras conversas, por sempre serem tão prestativos, e pela confiança e oportunidade de continuar essa jornada com vocês nos próximos anos.

Agradeço também a todos que de alguma forma colaboraram para a realização desta pesquisa, pois sem vocês não seria possível.

À veterinária Jenif e à toda a equipe do LCE, Cláudio, Leia e Domingos, agradeço toda a ajuda, tempo disponível, atenção e dedicação nos cuidados com os ratinhos.

À doutoranda Carolina Oliveira, pela imensa ajuda com a micro-CT e por tudo que me ensinou durante este tempo. Deixo aqui meus agradecimentos também ao Laboratório de Instrumentação Nuclear - Coppe/UFRJ, aonde foram realizadas as microtomografias.

Ao Prof. Dr. Fábio Ramoa, pela boa vontade em colocar o Laboratório de Patologia Oral à nossa disposição, por toda a ajuda com a histologia e imunohistoquímica; e à técnica Aline, por toda a presteza no preparo das lâminas e preocupação com a qualidade do nosso trabalho. Apreendi muito com vocês.

Aos alunos de iniciação científica: Alexandre Freitas, a quem devo agradecer muito por todo o tempo disponível, pelas inúmeras aplicações de nicotina aos sábados e domingos, e pela grande dedicação; à Caroline Cassimiro, que chegou ao final do projeto para complementar a nossa equipe. Neste ano tem mais!

Aos membros da banca de qualificação e defesa, pelas correções, críticas e esclarecimentos. Vocês acrescentam muito a este trabalho.

Deixo aqui minha eterna gratidão a todos que colaboraram para mais essa conquista.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

José de Alencar

RESUMO

PINTO, Karem Paula. **Efeitos do consumo de álcool e nicotina no desenvolvimento da periodontite apical em ratos**. 2020. 70 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do consumo crônico de álcool e nicotina, quando utilizados isoladamente ou simultaneamente, no desenvolvimento de lesões periapicais induzidas em ratos. Vinte e oito ratos machos de linhagem *Wistar*, com cerca de 60 dias de vida, foram utilizados nesse estudo. Quatorze ratos foram submetidos ao consumo de solução alcoólica a 25%, e quatorze ao consumo de apenas água filtrada. Após cinco semanas de adaptação à dosagem de álcool, metade dos animais de cada grupo passou a receber injeção intraperitoneal diária de solução salina, enquanto a outra metade recebeu injeção intraperitoneal diária de solução de nicotina. Sete dias após o início da administração da nicotina, os ratos foram anestesiados e a polpa do primeiro molar inferior esquerdo foi exposta para indução da lesão apical. Vinte e oito dias após o acesso pulpar os animais foram eutanasiados e os fragmentos da mandíbula foram removidos. Durante todo o experimento os animais foram pesados, e o consumo de comida e água foi medido. O tamanho da lesão periapical foi medido a partir de imagens de microtomografia computadorizada, onde foram calculados o maior diâmetro, área e volume da lesão. Após preparo histológico, as amostras foram submetidas à coloração com hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica e à testes imunohistoquímicos para avaliar a expressão dos marcadores de atividade osteoclástica RANKL e PTHrP. A análise estatística foi submetida com nível de significância de 5%. Os dados não-paramétricos foram analisados utilizando o ensaio de *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn*, enquanto ANOVA seguido do teste de *Tukey* foram realizados para os dados paramétricos. Os grupos que receberam álcool tiveram menor consumo de comida e água e ganharam menos peso quando comparados aos grupos não-alcoólicos ($p < 0,05$). O grupo Álcool + Nicotina apresentou lesões com maior volume e área, quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$), enquanto os grupos Álcool e Nicotina apresentaram lesões maiores que o grupo Controle ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa no maior diâmetro das lesões entre os grupos ($p > 0,05$). Os grupos Nicotina, Álcool e Álcool + Nicotina apresentaram escores de resposta inflamatória maiores que o grupo controle ($p < 0,05$). Da mesma forma, os grupos experimentais apresentaram maior imunorreação aos anticorpos contra RANKL e PTHrP do que o grupo Controle. Diante dos presentes resultados, pode-se concluir que tanto o álcool quanto a nicotina contribuíram para a exacerbação da resposta inflamatória e um maior desenvolvimento das lesões perirradiculares. A associação das duas substâncias potencializa seus efeitos prejudiciais.

Palavras-chave: Tabagismo. Alcoolismo. Endodontia. Periodontite apical. Microtomografia. Osteoclastogênese.

ABSTRACT

PINTO, Karem Paula. **Effects of alcohol and nicotine consumption on the development of apical periodontitis in rats.** 2020. 70 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

This study aimed to evaluate the effects of chronic alcohol and nicotine consumption, when used alone or simultaneously, on the development of induced periapical lesions in rats. Twenty-eight male Wistar rats, about 60 days old, were used in this study. Fourteen rats were exposed to consumption of alcoholic solution at 25%, while fourteen drunk only filtered water. After five weeks of adaptation to alcohol dosing, half of the animals in each group received daily intraperitoneal injection of saline solution, while the other half received daily intraperitoneal injection of nicotine solution. Seven days after the beginning of nicotine administration, the rats were anesthetized and the pulp of the left lower first molar was exposed to induce apical lesion. Twenty-eight days after pulp access the animals were euthanized and the mandible fragments were removed. Throughout the experiment, the animals were weighed, and food and water consumption were measured. The apical lesion size was measured from micro-computed tomography images, where the largest diameter, area and volume of the lesion were calculated. After histological preparation, the samples were submitted to hematoxylin and eosin staining for histopathological evaluation and immunohistochemical tests to evaluate the expression of the osteoclastic activity markers RANKL and PTHrP. Statistical analysis was submitted with a significance level of 5%. Nonparametric data were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test, while ANOVA followed by Tukey's test was performed for parametric data. The Alcohol + Nicotine group presented lesions with larger volume and area when compared to the other groups, while the Alcohol and Nicotine groups presented larger lesions than the Control group ($p < 0.05$). There was no significant difference in the largest diameter of lesions between groups ($p > 0.05$). The groups that received alcohol had lower solid and liquid consumption and gained less weight when compared to the non-alcoholic groups ($p < 0.05$). The Nicotine, Alcohol and Alcohol + Nicotine groups had higher inflammatory response scores than the control group ($p < 0.05$). Similarly, the experimental groups showed higher immunoreaction against RANKL and PTHrP antibodies than the Control group. According to the present results, alcohol or nicotine consume contributed to the exacerbation of the inflammatory response and a higher development of the periradicular lesions. The association of both substances enhances their harmful effects.

Keywords: Tobacco smoking. Alcoholism. Endodontics. Periapical periodontitis.
Micro-computed tomography. Osteoclastogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Dados do cálculo amostral.....	28
Tabela 1 -	Divisão dos grupos da pesquisa.....	30
Figura 2 -	Acesso pulpar.....	31
Figura 3 -	Lima 10 introduzida no acesso realizado na fossa mesial do dente	32
Figura 4 -	Fluxograma das etapas experimentais <i>in vivo</i>	33
Figura 5 -	Sequência de análise da lesão periapical nas imagens obtidas por micro-CT.....	35
Figura 6 -	Imagens 3D.....	36
Tabela 2 -	Valores médios $\pm$ desvio padrão do consumo sólido, consumo líquido e variação de peso dos ratos	41
Tabela 3-	Medidas das lesões perirradiculares por análise microtomográfica.....	42
Figura 7-	Imagens da lesão periapical em corte axial.....	43
Figura 8-	Corte sagital.....	44
Figura 9-	Imagens de micro-CT com demarcação da lesão.....	45
Figura 10-	Imagens tridimensionais.....	46
Tabela 4-	Número de espécimes aos quais foram atribuídos os diferentes escores de acordo com a intensidade da resposta inflamatória na avaliação histopatológica.....	47
Figura 11-	Fotomicrografias da lesão periapical.....	48
Figura 12-	Fotomicrografias da lesão periapical.....	49
Figura 13-	Fotomicrografias da lesão periapical imunomarcada com anticorpos contra RANKL.....	51
Figura 14-	Fotomicrografias da lesão periapical imunomarcada com anticorpos contra PTHrP.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
IL	Interleucina
LCE	Laboratório de Cirurgia Experimental
MICRO-CT	<i>Microcomputed tomography</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PTHrP	<i>Parathyroid hormone-related protein</i>
RANK	<i>Receptor activator of NF-κB</i>
RANL	<i>Receptor activator of NF-κB ligand</i>
ROI	<i>Region of interest</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
nº	Número
°C	Grau celsius
<i>N</i>	Número amostral
µl	Microlitro
ml	Mililitro
g	Grama
Kg	Quilo
X	Vezez
>	Maior
+	Mais
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	13
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
1.1	Influência do tabagismo no desenvolvimento de periodontite apical.....	15
1.2	Influência do alcoolismo no desenvolvimento de periodontite apical.....	18
1.3	Efeitos simultâneos do álcool e da nicotina.....	22
1.4	Métodos de avaliação da periodontite apical em ratos.....	22
2	PROPOSIÇÃO.....	25
3	HIPÓTESES.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	Aspectos éticos.....	27
4.2	Cálculo do tamanho da amostra.....	27
4.3	Seleção e preparo dos animais.....	28
4.4	Consumo do álcool e nicotina.....	29
4.5	Indução da lesão periapical.....	30
4.6	Avaliação da perda óssea.....	33
4.6.1	<u>Parâmetros para aquisição das microtomografias.....</u>	33
4.6.2	<u>Parâmetros para análise.....</u>	34
4.7	Análise histopatológica.....	37
4.7.1	<u>Hematoxilina e eosina.....</u>	37
4.7.2	<u>Imunohistoquímica.....</u>	38
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
6	RESULTADOS.....	41
6.1	Ganho de peso e ingestão sólida e líquida.....	41
6.2	Micro-CT.....	41
6.3	Análise histológica.....	47
6.4	Análise imuno-histoquímica.....	50
7	DISCUSSÃO.....	53
	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	ANEXO – Aprovação do Comitê de Ética para Pesquisa com Animais.....	70

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) o tabagismo e o consumo excessivo de álcool fazem parte das principais causas de morte evitável no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011, 2014, 2017). Anualmente, 3,3 milhões de mortes resultam do uso nocivo do álcool, enquanto o tabagismo é responsável pela morte anual de cerca de seis milhões de pessoas, e espera-se que esse número alcance oito milhões até o ano 2030 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011, 2014). Hoje em dia, estima-se que exista um total de 1,1 bilhão de fumantes no mundo. No Brasil, houve um aumento de 43,5% no consumo de álcool na última década e apesar da diminuição do número de fumantes ao longo dos últimos 25 anos, o país ocupa o 8º lugar no ranking do número absoluto de fumantes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

O consumo de álcool está associado à efeitos deletérios em diferentes órgãos do corpo e pode afetar o tecido ósseo devido ao seu efeito tóxico sobre a atividade e proliferação dos osteoblastos (AMARAL; LUIZ; LEÃO, 2008). Como consequência de seus efeitos tóxicos sobre fígado, osso, sistema imunológico e nutrição, o álcool pode interferir no mecanismo de resposta inflamatória da doença periodontal (SOUZA et al., 2006). Diversos estudos realizados em ratos sugerem que o consumo de álcool pode aumentar a perda óssea alveolar (IRIE et al., 2008; SOUZA et al., 2006; SOUZA et al., 2009), atribuído ao efeito direto do álcool sobre a quantidade e a atividade dos osteoblastos e osteoclastos e aumento da apoptose de osteócitos (MAUREL et al., 2012).

O tabagismo aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de várias doenças, incluindo câncer, doença vascular, doença pulmonar obstrutiva crônica, bem como doenças periodontais (JOHNSON; SLACH, 2001; KUBOTA; YANAGITA; MORI, 2016; PALMER et al., 1999). A nicotina, um dos principais constituintes do cigarro, tem sido utilizada em diversos estudos para investigar os efeitos do tabagismo (DEVECI et al., 2018; KIRSCHNECK; PROFF; MAURER, 2015; KUBOTA; YANAGITA; MORI, 2016; NOCITI JR. et al., 2000). Essa substância causa vasoconstrição, redução da oxigenação local, limita a chegada de constituintes sanguíneos e a remoção de produtos bacterianos, causando dano tecidual e comprometimento da resposta imunológica (PALMER et al., 1999). Estudos que avaliaram a progressão de periodontite em ratos, mostraram maior perda óssea (NOCITI JR. et al., 2000; PEREIRA VASCONCELOS et al., 2013) e retardo no reparo ósseo (KUBOTA;

YANAGITA; MORI, 2016) nos grupos expostos à nicotina. Além disso, outro estudo mostrou um aumento da osteoclastogênese e reabsorção radicular em ratos durante movimentação ortodôntica nos grupos sob administração de nicotina (KIRSCHNECK; PROFF; MAURER, 2015).

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea e o principal mecanismo de regulação da atividade osteoclástica ocorre através da tríade RANK (receptor ativador do fator nuclear *kappa* B), RANKL (ligante de RANK) e OPG (osteoprotegerina) (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). A ligação de RANKL a RANK, seu receptor expresso na superfície de precursores dos osteoclastos, inicia uma cascata de sinalização que resulta na diferenciação e ativação dos osteoclastos. A interação RANKL-RANK pode ser inibida pelo receptor endógeno OPG (SASAKI et al., 2016). A proteína PTHrP (proteína relacionada ao hormônio da paratireóide) inibe a expressão de OPG, levando assim a um aumento do processo de osteoclastogênese (BOABAID et al., 2004). Portanto, RANKL e PTHrP funcionam como marcadores de metabolismo ósseo (KUMAMOTO; OOYA, 2004). Um estudo demonstrou um aumento na expressão de RANKL em ratos expostos ao consumo de álcool (CALLACI et al., 2009).

Os efeitos da nicotina e do álcool nos tecidos periodontais tem sido amplamente pesquisados (COSTA-RODRIGUES et al., 2018; JOHNSON; SLACH, 2001; KUBOTA; YANAGITA; MORI, 2016; NOCITI et al., 2000; PALMER et al., 1999; SOUZA, et al., 2006; SOUZA et al., 2009), porém pouco se sabe sobre os efeitos combinados do álcool e da nicotina sobre esses tecidos quando usados simultaneamente. Dois estudos realizados em ratos mostraram um efeito sinérgico da combinação álcool e nicotina: um na neoformação óssea prejudicada ao redor de implantes de hidroxiapatita (SOARES et al., 2010) e outro na progressão da periodontite (PEREIRA VASCONCELOS et al., 2013).

A periodontite apical é uma doença infecciosa oral caracterizada pela destruição óssea inflamatória na região periapical e, até o presente momento, não há trabalhos publicados avaliando a influência do consumo simultâneo de álcool e nicotina sobre a lesão periapical. Devido aos conhecidos efeitos deletérios causados por essa combinação na progressão da doença periodontal e às semelhanças na progressão das doenças periodontal e periapical, o objetivo deste trabalho será avaliar os efeitos do álcool e nicotina quando utilizados isoladamente ou simultaneamente, no desenvolvimento de periodontite apical induzida em ratos e na expressão dos marcadores de osteoclastogênese RANKL e PTHrP.

1 REVISÃO DA LITERATURA

A periodontite apical ocorre em resposta à infecção endodôntica e é caracterizada pela destruição óssea inflamatória na região periapical do elemento afetado, resultando em inflamação local, destruição dos tecidos periapicais e reabsorção óssea (NAIR, 2004). O desequilíbrio entre micro-organismos patogênicos e a eficácia da resposta do hospedeiro em combater a infecção podem alterar o ambiente de desenvolvimento da doença (AMARAL; LUIZ; LEÃO, 2008). Na tentativa de conter a propagação da infecção, um processo crônico inflamatório se instala com a formação de uma lesão de tecido granulomatoso revestida por uma densa cápsula fibrosa (RÔÇAS; SIQUEIRA; SANTOS, 2004).

A doença periapical nada mais é do que uma inflamação do periodonto ao redor do ápice radicular. A etiologia e desenvolvimento da periodontite apical e da doença periodontal são semelhantes. Com uma microflora de organismos patogênicos predominante de bactérias anaeróbias (ZEHNDER et al., 2002), ambas as doenças crônicas inflamatórias se desenvolvem com a migração de células de defesa, osteoblastos e osteoclastos para o local da infecção (SILVA et al., 2007).

Com base na evidência de que o tabagismo é um importante fator de risco no desenvolvimento da periodontite crônica, é possível assumir que também possa exercer uma influência negativa no periodonto apical de dentes comprometidos endodonticamente (BERGSTROEM; BABCAN; ELIASSON, 2004). O mesmo se espera em relação ao consumo crônico de álcool, que também tem sido relacionado ao agravamento da perda óssea periodontal (TEZAL et al., 2004).

1.1 Influência do tabagismo no desenvolvimento da periodontite apical

O tabagismo compromete a resposta imunológica do paciente a um processo inflamatório e/ou de origem infecciosa, interferindo na sua resposta imune inata e adquirida, com supressão da quimiotaxia e das funções de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos T, e redução do nível de anticorpos (PALMER et al., 1999). Com isso, o tabagismo pode contribuir para a necrose precoce do tecido pulpar, uma vez que a polpa e os tecidos

perirradiculares nesses pacientes são menos capazes de limitar a destruição proveniente de uma infecção bacteriana (KRALL et al., 2006).

O tabagismo também pode induzir uma forte reação sistêmica inflamatória, aumentando os níveis de proteína C reativa e liberando substâncias degradadoras de tecido como colagenases, proteases e citocinas pró-inflamatórias, exercendo um efeito local e direto (PALMER et al., 1999; SEGURA-EGEA; MARTIN-GONZALES; CASTELLANOS-COSANO, 2015). Além disso, interfere no estado dos tecidos perirradiculares através da redução do suprimento sanguíneo, restringindo a chegada de nutrientes e oxigenação no local; e na alteração da síntese de colágeno pelos fibroblastos, prejudicando o reparo tecidual das lesões e acelerando a perda óssea (SEGURA-EGEA; MARTIN-GONZALES; CASTELLANOS-COSANO, 2015). O tabagismo também está associado aos níveis mais baixos de vitamina D, relacionada à regulação endócrina dos níveis de cálcio e do processo de osteoclastogênese, bem como aos níveis mais baixos de osteocalcina, um marcador bioquímico de formação óssea. Todos esses fatores predispõem ao aumento no desenvolvimento da lesão perirradicular em resposta à uma infecção endodôntica (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2012).

Devido aos seus efeitos adversos no processo de cicatrização óssea, acredita-se que o tabagismo possa, além de facilitar o processo de destruição óssea periapical, interferir nos eventos de reparo pós-tratamento endodôntico. Com isso, a fase de cicatrização da periodontite apical pós-tratamento de canal radicular também pode ser retardada e, mais frequentemente, levar ao insucesso (BERGSTROEM; BABCAN; ELIASSON, 2004).

Está bem embasada na literatura a relação dose-dependente dos efeitos do tabagismo em tecidos periodontais: o número de cigarros que o paciente consome, a intensidade e a duração do uso, e o período de abstinência em casos de interrupção afetam o impacto prejudicial do tabagismo na perda óssea (TOMAR; ASMA 2000; WARNAKULASURIYA; DIETRICH; BORNSTEIN, 2010). O risco do paciente ter a necessidade de um tratamento endodôntico aumenta com o tempo de exposição ao fumo e diminui com o período de abstinência, também apontando uma relação dose-dependente entre tabagismo e a necessidade de tratamento endodôntico (KRALL et al., 2006).

A maior necessidade de tratamento endodôntico em fumantes é um dos reflexos dos efeitos prejudiciais do tabagismo. O tabagismo tem sido relacionado a um aumento na prevalência de cárie devido à redução da salivação (DUVILLARD; SINZINGER; BERENT, 2012; EDER et al, 2000; RAD et al., 2010). A microbiota destes pacientes apresenta número aumentado de *lactobacillus* e *Streptococcus mutans*, e os mesmos apresentam pior higiene

bucal, hábitos alimentares mais nocivos (maior consumo de açúcar) e frequência reduzida de visitas ao dentista (HUANG; GREGORY 2012; TALHOUT; OPPERHUIZEN; VAN AMSTERDAM, 2006). O aumento da prevalência de cárie dentária tem como consequência o comprometimento pulpar e o aumento da prevalência da doença periapical em fumantes (BUKMIR; GRGIĆ; BRUMINI, 2016).

Diversos estudos transversais avaliaram, através de radiografias, a associação entre o tabagismo e o desenvolvimento de lesões periapicais em pacientes. A maioria desses estudos demonstrou que pacientes tabagistas apresentam maior prevalência de periodontite apical (AL-NAZHAN et al., 2017; BUKMIR; GRGIĆ; BRUMINI, 2016; KIRKEVANG; WENZEL, 2003; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2012; SEGURA-EGEA et al., 2008).

O tabagismo é considerado um fator de risco bem estabelecido para doença periodontal (ALBANDAR, 2002). Dos mais de 4000 produtos químicos contidos no fumo do tabaco, a nicotina parece desempenhar o papel mais importante no que diz respeito aos efeitos patobiológicos no aparelho de inserção periodontal (KIRSCHNECK; PROFF; MAURER, 2015; KUBOTA; YANAGITA; MORI, 2016; MALHOTRA; KAPOOR; GROVER, 2010; WANG; LIU; WANG, 2010). Com isso, diversos estudos têm avaliado a influência da administração de nicotina no desenvolvimento de periodontite e outras interferências dentro da Odontologia (DEVECI et al., 2018; KIRSCHNECK et al., 2017; KUBOTA, YANAGITA, MORI, 2016; LIU et al., 2010; NOCITI et al., 2000; NOGUEIRA-FILHO et al., 2004).

Nociti Jr. et al. (2000) avaliaram os efeitos da nicotina na perda óssea periodontal em ratos, através do modelo experimental base para desenvolvimento de periodontite nesses animais. Foram colocadas ligaduras de algodão no sulco dos dentes a serem avaliados para indução da periodontite, e os animais foram submetidos durante 30 dias à injeções intraperitoneais diárias de soluções de nicotina, cada grupo experimental com diferentes dosagens: 0,13 µl de solução de nicotina/ml de solução salina, 0,19 µl e 0,26 µl. Foi observado que nos grupos submetidos à administração de nicotina houve maior perda óssea.

Nogueira-Filho et al. (2004) avaliaram os efeitos da nicotina na perda óssea alveolar induzida por trauma oclusal em ratos, com administração de injeção intraperitoneal diária de solução de nicotina (0.44 mg/ml) também por 30 dias. O estudo mostrou que o grupo submetido à administração da nicotina apresentou maior perda óssea.

Liu et. al. (2010) avaliaram por microtomografia computadorizada (micro-CT) a perda óssea alveolar em ratos submetidos à injeção intraperitoneal de nicotina, em duas diferentes dosagens, 0.83 mg de nicotina/kg/dia e 1.67 mg/kg/dia, por 14 e 28 dias. Comparados ao

grupo controle, os grupos submetidos à administração de nicotina apresentaram maior perda óssea e menor densidade óssea mineral, de forma dose-dependente.

Kubota; Yanagita; Mori (2016) realizaram um estudo também através do modelo experimental de periodontite em ratos. Os animais foram submetidos à injeção intraperitoneal diária de solução de nicotina (16 µg/ 20 g de peso) e colocação da ligadura por 7 dias. A análise feita através de micro-CT revelou que houve um aumento na perda óssea alveolar de maneira dose-dependente nos grupos submetidos à nicotina. Já a análise imunohistoquímica mostrou uma maior quantidade de osteoclastos nos tecidos periodontais e maior expressão dos marcadores de osteoclastogênese nos grupos expostos à nicotina. Além disso, a nicotina atenuou o reparo ósseo observado após a remoção das ligaduras, sugerindo que essa substância não apenas promove a destruição periodontal, mas também atrasa o seu reparo.

Kirschneck et al. (2017) avaliaram os efeitos da nicotina na movimentação ortodôntica em ratos através de tomografia *Cone Beam*, avaliação histológica e PCR *real time*. Concluíram que houve um aumento da osteoclastogênese, nos animais sob administração subcutânea diária de nicotina (1,89 mg/ kg de peso), com aumento na velocidade de movimentação dentária, na extensão da reabsorção radicular e na expressão de marcadores de inflamação e osteoclastogênese.

Deveci et al. (2018) avaliaram histologicamente a influência da nicotina no aparato periodontal de ratos. No grupo sob administração subcutânea diária de sulfato de nicotina (2 mg/kg de peso) durante 28 dias, foi observado maior proliferação de células endoteliais, aumento da atividade angiogênica, sinais de inflamação, desordens vasculares e degeneração celular, além de alterações na síntese de colágeno.

Até o momento, não há na literatura estudos que avaliem a influência da nicotina diretamente no desenvolvimento de lesão periapical em ratos.

1.2 Influência do alcoolismo no desenvolvimento da periodontite apical

A alta ingestão de álcool causa efeitos prejudiciais ao tecido ósseo, com redução da proliferação celular e da síntese de proteínas (MAUREL et al., 2012). Estudos demonstraram que o álcool inibe a ação da fosfatase alcalina, reduz o nível de cálcio no sangue, reduz a densidade óssea mineral e aumenta a perda óssea alveolar (FRIDAY; HOWARD, 1991; GALINDO-MORENO et al., 2005; SAMPSON, 2002). O consumo crônico de álcool altera a

microarquitetura do osso, que define suas propriedades e resistência, além de reduzir a espessura e o volume ósseos e aumentar a erosão da sua superfície, tanto que a osteoporose é mencionada como consequência secundária do alcoolismo (MAUREL et al., 2012).

O alto consumo de álcool também provoca um atraso no processo de cicatrização óssea. O alcoolismo está associado à redução da massa e resistência do osso devido a um desequilíbrio no processo de remodelação óssea, com predominância da redução da formação óssea e da aposição mineral (MAUREL et al., 2012). O álcool suprime a síntese de matriz óssea, possivelmente por inibição da proliferação celular e má diferenciação de células mesenquimais no tecido de reparação (CHAKKALAKAL, 2005). Diversos estudos demonstraram o fracasso na cicatrização de fraturas ósseas, com deficiência no reparo ósseo em alcoolistas quando comparados a não-alcoolistas (ELMALI et al., 2002; NYQUIST et al., 1999; PASSERI; ELLIS; SINN, 1993; ROPER et al., 2016).

O alcoolismo leva à alterações nas cascatas de sinalização e níveis de hormônios que influenciam o metabolismo ósseo, como a vitamina D, o paratormônio, o hormônio do crescimento e a leptina (GADDINI et al., 2016). Além disso, a administração crônica de etanol pode reduzir a diferenciação e atividade dos osteoblastos (FRIDAY; HOWARD, 1991; SUH et al., 2005) e aumentar a diferenciação e atividade de osteoclastos (CHEUNG et al., 1995; DAI et al., 2000). Com isso, a formação óssea é reduzida e a reabsorção óssea aumentada (GADDINI et al., 2016).

É importante dizer que estudos têm reportado efeitos positivos do consumo de álcool no osso. Esses estudos se referem ao consumo leve a moderado de álcool, relatando que a ingestão de cerca de um copo de bebida alcoólica por dia (consumo leve) a dois ou três copos de bebida alcoólica por dia (consumo moderado), independente do tipo de bebida, não tem efeitos no tecido ósseo ou ainda promove efeitos benéficos, aumentando a densidade óssea mineral (GANRY; BAUDOIN; FARDELLONE, 2000; JUGDAOHSINGH et al., 2006; TUCKER et al., 2009). Esses estudos estão de acordo com achados médicos que apontam que o leve consumo de álcool pode gerar efeitos benéficos à saúde, principalmente cardiovasculares (AGARWAL, 2002; ELKIND et al., 2011). A plausível explicação para esses achados é que mecanismos biológicos em comum podem estar envolvidos na patogênese ou prevenção dessas doenças crônicas e o alcoolismo pode interferir na modulação de alguns marcadores pró-inflamatórios como IL-6 e TNF- α (MARQUES-VIDAL et al., 2012). Além disso, o padrão de consumo do álcool pode tanto prejudicar como reparar a função imunológica pela modulação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T (DIAZ et al., 2002; SZABO, 1999). No entanto, dependendo da bebida ingerida, gênero da amostra

estudada e idade, o consumo moderado de álcool poderia levar a uma maior perda óssea. Fatores de confundimento como componentes das bebidas e fatores hormonais podem interferir nessas conclusões (MAUREL et al., 2012).

Os efeitos do álcool no tecido ósseo parecem ser dose-dependente. O consumo excessivo e a longo prazo leva a efeitos deletérios como diminuição da massa óssea, redução da densidade óssea mineral e má reparação óssea (CHAKKALAKAL, 2005; TURNER et al., 2011). A abstenção ao álcool restaura a função dos osteoblastos em proporção ao período de abstinência (DIAMOND et al., 1989; LAITINEN et al., 1992; LINDHOLM et al., 1991). Além disso, estudos comprovaram que após a interrupção da ingestão de álcool, ocorre aumento da massa óssea, das concentrações de vitamina D e de osteocalcina, um dos marcadores de formação óssea (LAUING et al., 2008; MAUREL et al., 2012; NYQUIST et al., 1996; SAMPSON; SPEARS, 1999).

Diferentes mecanismos biológicos plausíveis explicam os efeitos negativos do álcool no osso: o álcool afeta diretamente o número e a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, bem como aumenta a apoptose de osteócitos; as alterações observadas podem ser moduladas, em parte, por uma rede de vias de sinalização de proteínas devido ao aumento do estresse oxidativo; alterações na diferenciação osteoblástica podem ser responsáveis pela baixa massa óssea e estão associadas à adipogênese, com aumento do acúmulo de gordura no osso medular; e pode haver efeitos diretos do consumo de álcool no osso, resultantes da diminuição da ingestão de calorias e de uma mudança na composição corporal, como efeito secundário de uma má nutrição (MAUREL et al., 2012). Além disso, o etanol estimula a reabsorção óssea, suprime a neoformação óssea e tem efeitos tóxicos no fígado, interferindo no metabolismo de diversas proteínas (TEZAL et al., 2001). Como o consumo crônico de etanol resulta em inflamação hepática, ocorre um aumento nas moléculas inflamatórias circulantes no sangue, como a proteína C-reativa, que pode também afetar a saúde dos tecidos orais (JARUGA et al., 2004).

O etanol tem um valor energético substancial (7,1 kcal/g). No alcoolismo crônico, o álcool representa em média, 50% da energia total ingerida pelo paciente (LIEBER, 2000). Como consequência, o álcool desloca muitos nutrientes, o que resulta em desnutrição primária (LIEBER, 2000). Além disso, desnutrição secundária pode ocorrer como resultado da má digestão ou má absorção causada por complicações gastrointestinais associadas ao alcoolismo, resultando em deficiência de proteínas e vitaminas (LIEBER, 2000, 2003).

Diversos estudos avaliaram os efeitos do consumo crônico de álcool na perda óssea periodontal em ratos (BASTOS et al., 2014; IRIE et al., 2008; SOUZA et al., 2006, 2009,

2017; WAGNER et al., 2016). Como base da metodologia desses estudos, foram colocadas ligaduras de algodão no sulco gengival do primeiro molar inferior dos ratos para induzir o desenvolvimento de periodontite, e os resultados foram comparados entre os grupos alcoolistas e controles.

Estudos em ratos submetidos à alta concentração de álcool (20%) sugerem que o álcool pode ter um efeito destrutivo na indução da perda óssea alveolar (SOUZA et al., 2006, 2009, 2017). Por outro lado, a baixa concentração de álcool (5%) apresentou um efeito protetor na perda óssea alveolar espontânea (LIBERMAN et al., 2011).

Souza et al. (2006) avaliaram o suporte ósseo periodontal em ratos submetidos a diferentes concentrações de álcool (10%, 20% e 30%). Houve maior destruição óssea periodontal nos grupos submetidos ao consumo de álcool, porém não foi observada uma relação dose-dependente entre eles. Os autores ainda sugerem que a alta dose de álcool teve efeito indireto na porcentagem de suporte ósseo devido à má nutrição.

Irie et al. (2008) observaram que ratos submetidos à dieta com 36% do total do valor calórico em álcool apresentaram aumento da inflamação periodontal, com aumento do infiltrado de leucócitos polimorfonucleares e maior produção de TNF-alfa. Também observaram que nesse grupo houve maior reabsorção óssea e maior dano oxidativo quando comparado ao controle.

Souza et al. (2009) avaliaram o desenvolvimento de periodontite em ratos submetidos à ingestão de 10% e 20% de álcool. Houve maior perda óssea alveolar nos grupos alcoolistas de maneira dose-dependente. Dantas et al. (2012) observaram que o consumo de etanol em ratos aumentou a expressão e atividade de diversos marcadores de inflamação periodontal.

Bastos et al. (2014) demonstraram em seu estudo que houve aumento da perda óssea alveolar e redução da densidade óssea em ratos submetidos à solução de 30% de cachaça (com 38% a 48% de álcool). Enquanto Wagner et al. (2016), quando avaliaram os efeitos do consumo de 15% de álcool por ratos, constataram que não houve interferências na perda óssea e nos valores de TNF alfa. Souza et al. (2017) observaram, através de análise morfométrica, que houve maior perda óssea alveolar nos ratos que foram submetidos à administração de solução alcoólica a 20% em seu estudo.

Até o momento, apenas uma linha de pesquisa avaliou os efeitos do consumo crônico de álcool no desenvolvimento de periodontite apical em ratos. Utilizando ratos *Wistar* machos, submetidos ao autoconsumo de solução com 20% de álcool, foram avaliados o tamanho da lesão periapical no primeiro molar inferior esquerdo através de radiografias (DAL-FABBRO et al., 2019a), a resposta inflamatória dos tecidos periapicais através de

histopatologia (DAL-FABBRO et al., 2019a, 2019b, 2019c) e a atividade osteoclástica através de imuno-histoquímica para RANKL, OPG e TRAP (DAL-FABBRO et al., 2019b, 2019c). Pode-se concluir que os ratos em dieta alcoólica apresentaram um efeito significativamente maior na severidade da periodontite apical, com exacerbação da resposta inflamatória e da osteoclastogênese (DAL-FABBRO et al., 2019a, 2019b, 2019c).

1.3 Efeitos simultâneos do álcool e nicotina

O efeito combinado do uso da nicotina e do álcool é de grande interesse, já que a maioria dos pacientes alcoolistas também é fumante (SAMPSON, 2002). Além disso, estudos em animais mostraram que a nicotina diminui a concentração de álcool no sangue, o que pode indicar maior absorção de álcool por alcoolistas que também são fumantes (CHAKKALAKAL, 2005; CHEN; PARNELL; WEST, 2001). Apesar disso, existem poucos estudos que avaliem seus efeitos simultâneos.

Um estudo realizado em ratos para avaliar os efeitos do álcool e nicotina na formação óssea ao redor de implantes de hidroxiapatita demonstrou que o consumo simultâneo das duas substâncias intensificou seus efeitos prejudiciais, onde o grupo álcool + nicotina apresentou menor volume de osso neoformado e menor resistência mecânica do osso. Comparando os grupos álcool e nicotina, o grupo álcool apresentou maior efeito prejudicial (SOARES et al., 2010).

Pereira Vasconcelos et al. (2013) avaliaram os efeitos simultâneos do consumo de álcool e nicotina no desenvolvimento de periodontite em ratos, utilizando uma concentração de 25% de álcool e 0.19 µl/ml de solução de nicotina. Observaram que o consumo simultâneo das duas substâncias intensificou seus efeitos e levou a uma maior perda óssea na área de furca.

Lee et al. (2016) avaliaram a prevalência e índice de periodontite em pacientes apenas fumantes, apenas alcoólatras, e fumantes e alcoólatras concomitantemente, em um estudo transversal com mais de 18 mil pacientes. Eles observaram que nos pacientes fumantes e alcoólatras, a prevalência de periodontite foi maior do que a estimativa esperada da soma dos efeitos do tabagismo e consumo de álcool.

1.4 Métodos de avaliação da periodontite apical em ratos

A análise da extensão da lesão periapical em ratos pode ser realizada através de diferentes métodos de captura de imagens. Para esta avaliação, é comum a utilização de radiografias (JARA et al., 2018; TRINDADE et al., 2017), entretanto, radiografias convencionais ou digitais não refletem a real extensão do processo destrutivo nos tecidos periapicais e geralmente sub-representam o tamanho da lesão (FERREIRA et al., 2006), sendo indicadas para avaliação de lesões periapicais extensas (DE ROSSI et al., 2005).

Na busca por uma técnica mais precisa, a microtomografia computadorizada (micro-CT) se tornou uma ferramenta importante para análise de lesões ósseas periapicais em estudos em modelos de pequenos animais (SCHAMBACH et al., 2010), sendo amplamente utilizada para tal propósito (DE OLIVEIRA et al., 2015; KANG et al., 2013; XU et al., 2019; YANG et al., 2014), principalmente para a obtenção dos valores quantitativos de área e volume das lesões (KALATZIS-SOUZA et al., 2017). A micro-CT fornece imagens de alta resolução (CAVANAUGH et al., 2004), permite a avaliação das lesões periapicais em diferentes planos (VON STECHOW et al., 2003) e a obtenção de imagens tridimensionais da amostra (YANG et al., 2014).

As imagens de micro-CT fornecem resultados equivalentes aos avaliados por meio de histologia, que é considerada o padrão-ouro para avaliação de lesões periapicais (BALTO et al. 2000; VON STECHOW et al., 2003). Após 4 a 6 semanas de exposição pulpar em ratos, estágio intermediário de desenvolvimento da periodontite apical, pode-se observar destruição óssea periradicular, granulomas, aumento de capilares, fibroblastos e exacerbação de células inflamatórias através da avaliação histopatológica por coloração com hematoxilina-eosina, o que é consistente com amostras humanas (XU et al., 2019). Além disso, métodos imunohistoquímicos podem ser empregados para avaliação da atividade osteoclástica no local da lesão periapical, através da utilização de anticorpos específicos para células que funcionam como marcadores de metabolismo ósseo (BARREIROS et al., 2018).

A tríade RANK (receptor ativador do NF- κ B), RANKL (ligante de RANK) e OPG (osteoprotegerina) é o principal mecanismo na regulação do processo de osteoclastogênese (BOYCE; XING, 2007). Essas substâncias são citocinas provenientes da família do TNF que, quando ativas e em taxas de equilíbrio, são responsáveis pela manutenção do remodelamento ósseo fisiológico. A ligação de RANKL a RANK, seu receptor expresso na superfície dos precursores dos osteoclastos, inicia uma cascata de sinalização que resulta na ativação destas

células e o início do processo de osteoclastogênese (SASAKI et al., 2016). O RANKL é uma das principais citocinas que regula o desenvolvimento, manutenção e ativação dos osteoclastos (LACEY et al., 1998). Porém, a interação RANKL-RANK pode ser inibida pelo receptor endógeno OPG (SASAKI et al., 2016). A OPG funciona como um ligante falso para o RANK impedindo sua ligação a RANKL, e assim, inibindo a ativação dos osteoclastos (SIMONET et al., 1997). Por sua vez, a proteína PTHrP (proteína relacionada ao hormônio da paratireóide) é capaz de inibir a expressão de OPG e aumentar a produção de RANKL, levando assim a um aumento do processo de osteoclastogênese (BOABAID et al., 2004; COWAN; SINGH; GHERT, 2012). Portanto, RANK, RANKL ou PTHrP são indicados como marcadores de metabolismo ósseo (KUMAMOTO; OOYA, 2004).

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos do álcool e nicotina, quando utilizados isoladamente ou simultaneamente, no desenvolvimento das lesões periapicais induzidas em ratos, na sua resposta inflamatória e na expressão de marcadores de atividade osteoclástica, através de microtomografia computadorizada, histopatologia e imuno-histoquímica.

3 HIPÓTESES

Hipótese nula (H0): Não houve diferença de tamanho da lesão periapical, assim como não foi observada diferença significativa na resposta inflamatória e expressão dos marcadores de atividade osteoclástica entre os grupos tratados ou não com nicotina e álcool.

Hipóteses alternativas:

H1: Houve diferença de tamanho da lesão periapical, assim como foi observada diferença significativa na resposta inflamatória e expressão dos marcadores de atividade osteoclástica entre os grupos tratados ou não com nicotina e álcool;

H2: Houve diferença de tamanho da lesão periapical, entretanto não foi observada diferença significativa na resposta inflamatória e expressão dos marcadores de atividade osteoclástica entre os grupos tratados ou não com nicotina e álcool;

H3: Não houve diferença de tamanho da lesão periapical, entretanto foi observada diferença significativa na resposta inflamatória e expressão dos marcadores de atividade osteoclástica entre os grupos tratados ou não com nicotina e álcool.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Este experimento foi realizado de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e das diretrizes da prática de eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Certificado da Comissão de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), autorizando a realização da pesquisa CEUA registro nº 049/2018, encontra-se em anexo (Anexo).

4.2 Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho da amostra foi estimado com base em estudos prévios e no cálculo amostral do Laboratório de Epidemiologia e Estatística descrito na figura abaixo (Figura 1). Para um nível de significância de 5% e 90% de poder do teste, seriam necessários 5 animais em cada grupo. Levando em consideração a possível perda de animais durante o experimento, dois animais foram acrescentado a cada grupo resultando em 7 animais por grupo, totalizando 28 animais (Figura 1).

Figura 1 - Dados do cálculo amostral

Tipo de estudo: não pareado			
Proporção de expostos entre os casos: 100%			
Proporção de expostos entre os controles: 25%			
Odds ratio calculado: inf			
Número de controles por caso: 1			
Nível de significância: 5%			
Poder do teste: 90%			
Teste de hipótese: monocausal			
Número de casos calculado: 5			
Número de controles calculado: 5			
Para outros valores do nível de significância e poder do teste temos:			
Nív. de signif.	Poder do teste	No. de casos	No. de controles
5%	65%	3	3
5%	70%	3	3
5%	75%	4	4
5%	80%	4	4
5%	85%	4	4
5%	95%	6	6
0.1%	90%	13	13
1%	90%	8	8
10%	90%	4	4

Fonte: LEE - Laboratório de Epidemiologia e Estatística. Disponível em <http://lee.dante.br/>.

4.3 Seleção e preparo dos animais

Foram selecionados 28 ratos machos de linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, Wistar), oriundos do biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental (LCE/ UERJ), com 60 dias de vida, pesando entre 250 e 340 gramas (g). Os animais foram mantidos em biotério climatizado (temperatura entre 21°C- 25°C, e ciclos de luz /escuro de 12 horas), dentro de boxes de plástico, recebendo ração balanceada e água *ad libitum* durante toda a fase experimental. Os ratos foram pesados antes do início do experimento, um vez por semana ao longo do experimento, e em seu término. Além disso, foi medido o consumo de ração e água pelos animais.

4.4 Consumo de álcool e nicotina

Metade dos animais foram submetidos à autoadministração de 25% de álcool (Etanol – Química Moderna, São Paulo, SP, Brasil). A solução de álcool foi preparada através da diluição de álcool etílico (etanol) absoluto na água de alimentação dos ratos. As doses de álcool foram gradualmente introduzidas através de aumentos semanais e sucessivos de 5% na concentração até se obter uma concentração final de 25%, para adaptação dos animais. Os outros quatorze ratos receberam apenas água filtrada.

Após as cinco semanas de adaptação, os animais não submetidos à autoadministração de álcool foram aleatoriamente designados para um dos grupos de tratamento A ou B, enquanto os animais submetidos à autoadministração de álcool foram aleatoriamente designados para um dos grupos de tratamento C ou D, segundo os seguintes esquemas de injeção intraperitoneal diária (PEREIRA VASCONCELOS et al., 2013) (Tabela 1):

Grupo A (Controle): 2 μ l/ g de peso corporal de solução salina e autoadministração de água filtrada;

Grupo B (Nicotina): 2 μ l/ g de peso corporal de solução de nicotina (N3876, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) com uma concentração de 0,19 μ l de nicotina/ ml de solução salina e autoadministração de água filtrada;

Grupo C (Álcool): 2 μ l/ g de peso corporal de solução salina e autoadministração de 25% de álcool (Etanol);

Grupo D (Álcool e Nicotina): 2 μ l/ g de peso corporal de solução de nicotina (N3876, Sigma-Aldrich) com uma concentração de 0,19 μ l de nicotina/ ml de solução salina e autoadministração de 25% de álcool (Etanol).

Tabela 1 - Divisão dos grupos da pesquisa

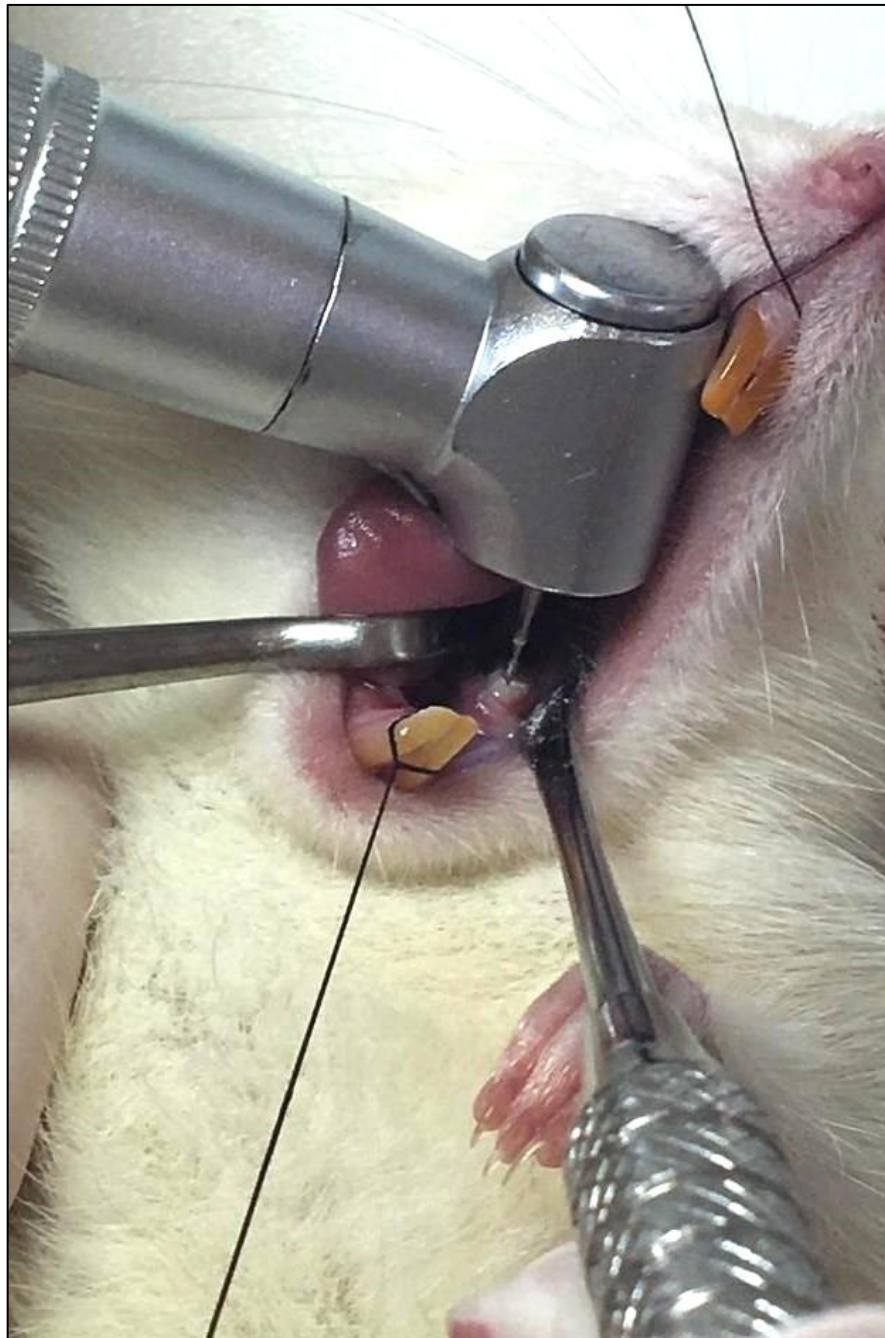
Grupo	Nº de ratos	Intervenções a serem realizadas
A - CONTROLE	07	Autoadministração de água filtrada e injeção intraperitoneal diária de solução salina
B - NICOTINA	07	Autoadministração de água filtrada e injeção intraperitoneal diária de solução de nicotina
C - ÁLCOOL	07	Autoadministração de 25% de álcool e injeção intraperitoneal diária de solução salina
D – ÁLCOOL E NICOTINA	07	Autoadministração de 25% de álcool e injeção intraperitoneal diária de solução de nicotina

Fonte: A autora, 2019.

4.5 Indução da lesão periapical

Após sete dias do início da administração da nicotina, os ratos foram anestesiados com administração intramuscular de 0,1ml de Cloridrato de Quetamina a 10% (Syntec, Cotia, SP, Brasil) associado à 0,05ml de Cloridrato de Xilasina a 2% (Syntec) por 100g de peso corporal do animal. Depois de anestesiados, a polpa do primeiro molar inferior esquerdo foi exposta com broca carbide número ¼ (KG Sorensen, Cotia, SP, Brasil) na fossa mesial da oclusal dos dentes numa profundidade equivalente ao diâmetro da broca para evitar perfuração na furca (Figura 2), e uma lima 10 foi introduzida para verificação do acesso (Figura 3).

Figura 2 – Acesso pulpar



Fonte: A autora, 2019.

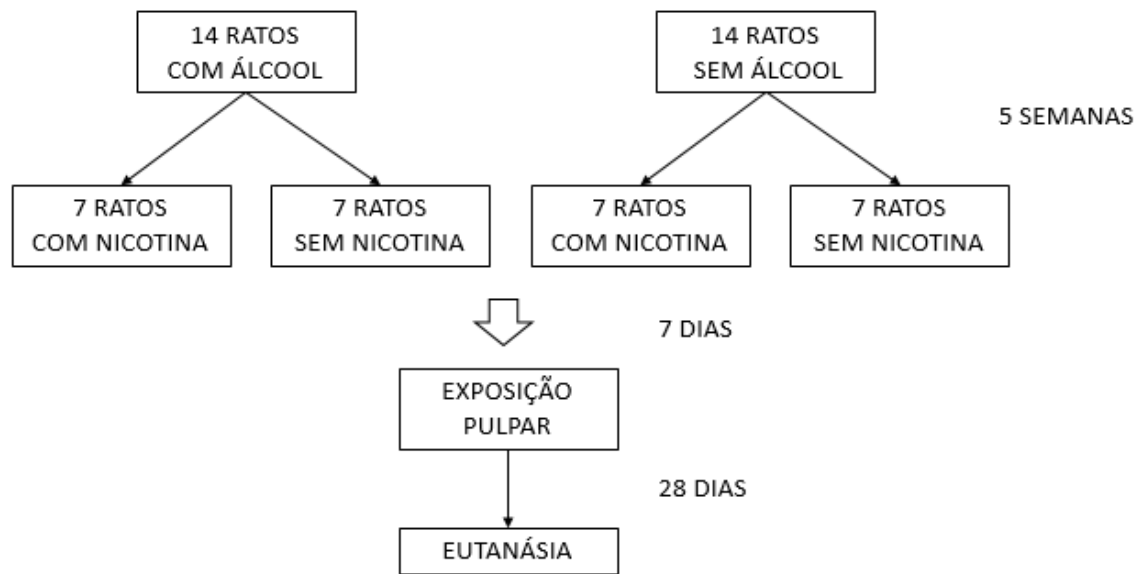
Figura 3 – Lima 10 introduzida no acesso realizado na fossa mesial do dente



Fonte: A autora, 2019.

Os elementos acessados ficaram expostos ao meio bucal por 28 dias, período em que foi continuado o esquema de administração de álcool e nicotina.

Figura 4 – Fluxograma das etapas experimentais *in vivo*.



Fonte: A autora, 2019.

4.6 Avaliação da perda óssea

Vinte e oito dias após o acesso pulpar os animais foram eutanasiados por sobredose de anestesia. Foram removidas as mandíbulas dos ratos, que foram armazenadas em solução de formol a 10% tamponado. As mandíbulas foram seccionadas com uma lâmina de bisturi e as hemimandíbulas esquerdas foram avaliadas. O tamanho da lesão periradicular foi medido a partir de imagens de microtomografia computadorizada, onde foram calculados o maior diâmetro, área e volume da lesão.

4.6.1 Parâmetros para aquisição das microtomografias

As hemimandíbulas dos ratos foram fixadas e escaneadas em um aparelho de micro-CT SkyScan 1173 (Bruker, Kontich, Bélgica). Os parâmetros para aquisição das imagens foram os seguintes: matriz 1120x1120, 70Kv e 114 mA, com filtro de alumínio 1-mm de

espessura, tempo de exposição de 320 milissegundos, passo de rotação de 0.3° e 360° em torno do eixo vertical. A resolução isotrópica foi de 17 µm. As imagens foram reconstruídas através do programa *NRecon* (v1.6.1.0; Bruker) com os seguintes parâmetros: 4 de correção do artefato de anel, correção de endurecimento do feixe de 40% e suavização de 2 para todas as imagens.

4.6.2 Parâmetros para análise

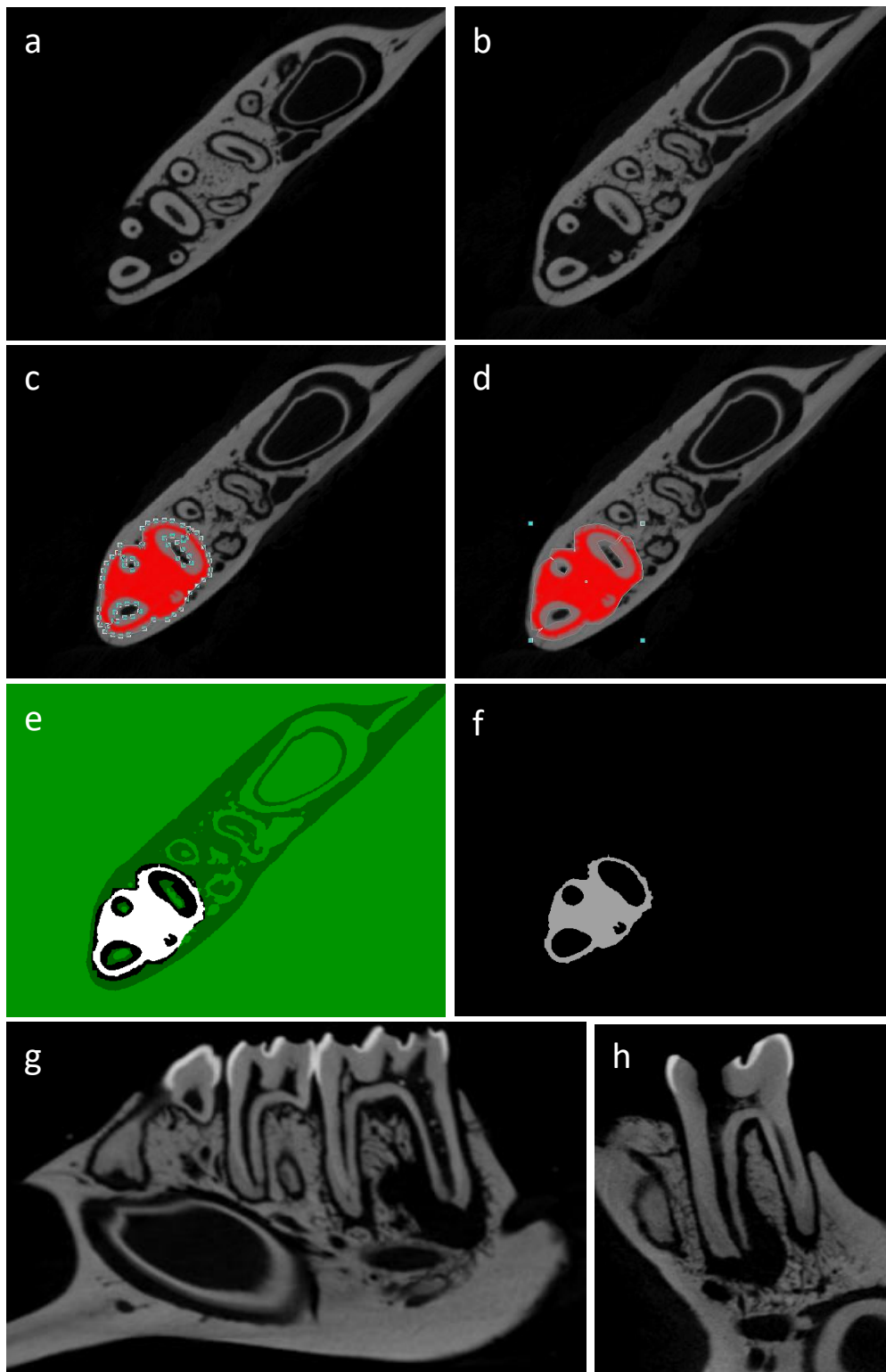
O processamento e a análise de imagens em plano axial foram realizados através do programa *CTan* (v1.6.6.0, Bruker), em um processo de segmentação da imagem, a fim de permitir a visualização e diferenciação da lesão perirradicular, do canal radicular e da dentina (Figura 5a/ 5b). A região de interesse (ROI) incluiu a área da lesão perirradicular e do ligamento periodontal em torno de todas as raízes do 1º molar inferior esquerdo, não incluindo o espaço referente aos canais radiculares e ligamento periodontal dos dentes adjacentes (Figura 5c/ 5d).

Foi feita a seleção manual da área de interesse a ser avaliada (ROI personalizado) em todos os conjuntos de imagens desde a primeira imagem em que todas as raízes aparecem circundadas por crista óssea até o desaparecimento da lesão. A análise foi realizada por um avaliador calibrado.

Através de análises bi e tridimensionais foram obtidas a área de superfície, maior diâmetro e volume da lesão perirradicular.

Também foram obtidas imagens em plano coronal e sagital através do programa *Data Viewer* (Tesa Technology, Renens, Suíça). As imagens em corte sagital foram utilizadas para visualização das raízes mesial e distal e comparação com a histologia (Figura 5g). Nas imagens em corte coronal podemos visualizar o acesso, se houve algum tipo de perfuração na região de furca ou fratura (Figura 5h).

Figura 5 – Sequência de análise da lesão periapical nas imagens obtidas por micro-CT

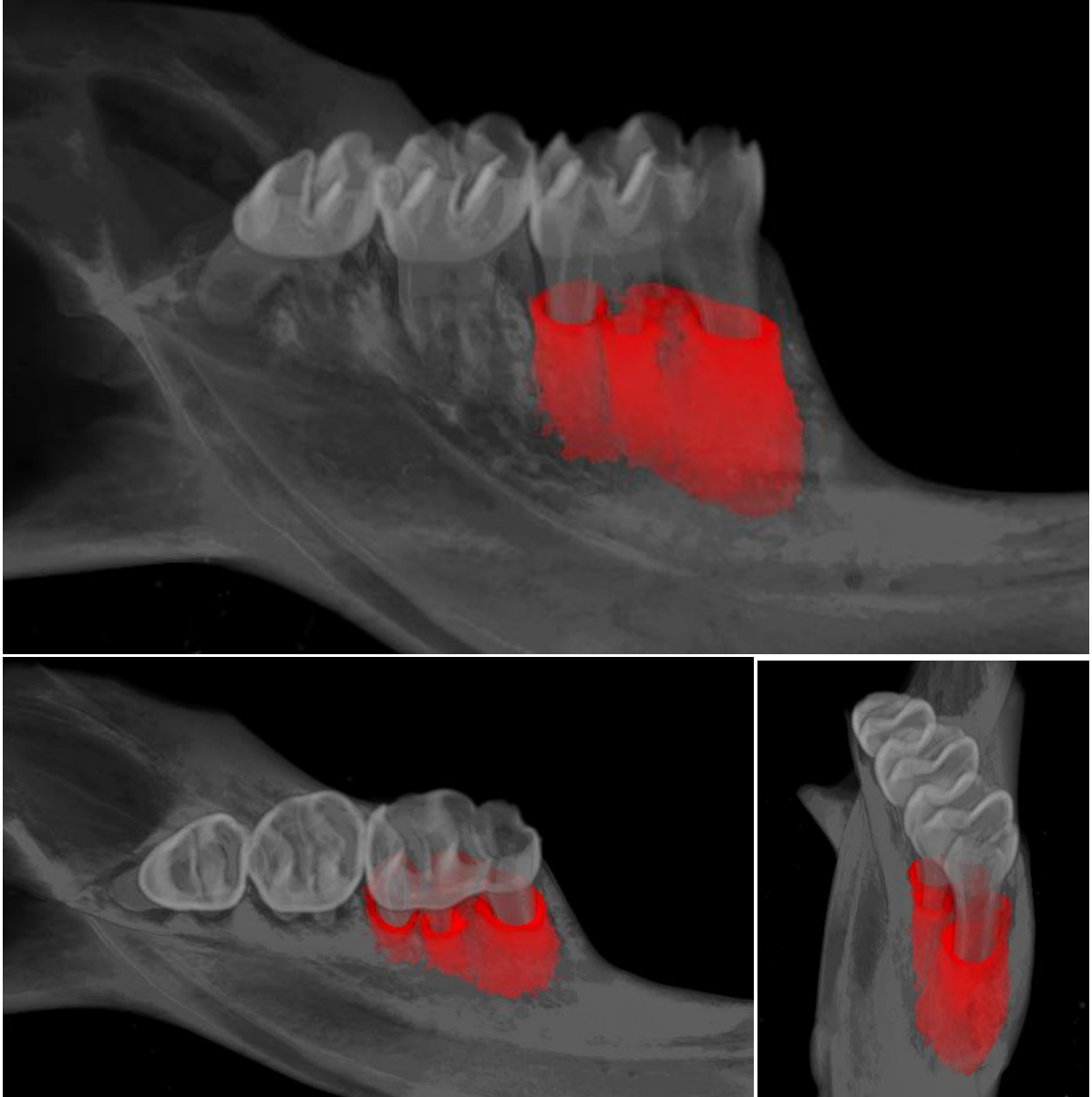


Legenda: Programa *CTan* - (a) imagem em corte axial; (b) lesão totalmente rodeada por osso: primeiro corte em que a lesão foi selecionada; (c) seleção manual da lesão/ personalização do ROI; (d) ROI selecionado; (e) lesão identificada por binarização das cores de acordo com a densidade; (f) lesão identificada para medição. Programa *Data Viewer* - (g) corte sagital; (h) corte coronal.

Fonte: A autora, 2019.

O programa *CTvox* (v1.6.6.0, Bruker Micro-CT, Kontich, Bélgica) foi utilizado para a visualização tridimensional dos modelos (Figura 6).

Figura 6 – Imagens 3D



Fonte: A autora, 2019.

4.7 Análise histopatológica

O processamento histológico das hemimandíbulas foi realizado no Laboratório de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). As peças cirúrgicas fixadas em formol a 10% foram descalcificadas em solução de ácido nítrico a 5% durante 10 dias. Posteriormente as peças foram desidratadas em soluções crescentes de etanol (70%, 90% e 100%) por trinta minutos em cada solução, clarificadas em dois banhos de soluções graduadas de xilol, por trinta minutos cada, e posteriormente incluídas em dois banhos de parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo (Spencer 820, Nova Iorque, NY, EUA) em fatias de 5 micrômetros de espessura e distendidos em lâminas de vidro.

Foram realizadas análises por microscopia óptica de cortes corados com hematoxilina e eosina. Além disso, a técnica de imuno-histoquímica para verificação dos biomarcadores RANK-L e PTHrP também foi realizada. Todas as imagens foram capturadas através da câmera do microscópio LEICA ICC50 HD (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

4.7.1 Hematoxilina e eosina

Após o processamento histológico, as lâminas foram mantidas em estufa (Nova Instruments, Piracicaba, SP) à 58°C por cinco minutos, desparafinizadas em três banhos de Xilol, hidratadas em cinco banhos de etanol em concentrações decrescentes, lavadas em água corrente por dois minutos, coradas com hematoxilina por 1 minuto, lavadas novamente em água corrente por 2 minutos e coradas com eosina por 2 minutos. Depois de coradas receberam dois mergulhos em água acética, foram desidratadas em cinco banhos em concentrações crescentes de etanol e clarificadas em três banhos em xilol. As lamínulas foram montadas com Entellan (Merck, Rio de Janeiro, RJ) e visualizadas no microscópio de luz LEICA ICC50 HD (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

O processo inflamatório na lesão periapical foi avaliado por um observador blindado às amostras analisadas. Foram analisados 3 cortes por amostra. Foram atribuídos escores para

a severidade da resposta inflamatória, avaliada segundo os seguintes critérios: tipo de infiltrado inflamatório presente (agudo, misto ou crônico) de acordo com os tipos de células presentes; inflamação localizada ou difusa; e presença de zonas de necrose. Além disso, uma análise semiquantitativa das imagens foi realizada através do *software Image-Pro Plus* versão 4.5.0.29 (Media Cybernetics, Rockville, MD, EUA) em dez campos por lâmina em magnificação de 100x e 400x. A quantidade de células inflamatórias foi medida por campo e a média foi utilizada para auxiliar na análise da severidade da inflamação tecidual (GOMES-FILHO et al., 2015). Os escores foram os seguintes:

- a. **Grau 0 (nenhuma):** nenhuma ou raras células inflamatórias dispersas;
- b. **Grau 1 (leve):** infiltração de células inflamatórias (<25 células); inflamação bem localizada no periápice ou limitada ao terço apical; sem áreas de necrose;
- c. **Grau 2 (moderada):** grande infiltração de células inflamatórias (25–125 células); inflamação crônica difusa no terço apical ou se estendendo até o terço médio e pouco presente na região de furca; poucas áreas de necrose;
- d. **Grau 3 (severa):** infiltração muito densa de células inflamatórias agudas e crônicas (>125 células); inflamação difusa, presente também na região de furca; áreas de necrose mais extensas.

4.7.2 Imunohistoquímica

As amostras foram submetidas à análise imunohistoquímica, realizada no Laboratório de Histopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Estácio de Sá.

Antes da coloração, as lâminas foram mantidas a 60°C por 40 minutos em forno. As lâminas foram desparafinizadas em três banhos de xilol de 5 minutos cada, hidratadas em concentrações decrescentes de etanol a 100%, 95% e 70% por 5 minutos cada, e lavadas duas vezes em água deionizada por 5 minutos cada. Após isso, as lâminas foram deixadas em banho-maria a 65°C por 1 hora usando tampão Tris EDTA pH 9,0 para recuperação antigênica. Após removidas do banho, foram resfriadas em temperatura ambiente (20 a 25°C) por 15 minutos e lavadas em 3 banhos de água deionizada. A atividade endógena da peroxidase foi bloqueada com o reagente de bloqueio enzimático endógeno duplo DAKO (Dako S2003) por 30 minutos e lavadas duas vezes em água deionizada. As lâminas foram

incubadas com uma diluição 1: 400 do anticorpo primário policlonal contra RANKL (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e anticorpo primário monoclonal contra PTHrP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) *overnight* (16 a 18 horas) a 4°C em geladeira. Após isso, as lâminas foram lavadas com PBS (do inglês *phosphate buffered saline*), 3 vezes por 5 minutos cada. Para revelação da reação imune, as lâminas foram incubadas utilizando um kit de detecção de anticorpo de coelho (Maxvision Bio PT03-L) por 15 minutos. Esse kit é composto por um anticorpo secundário de coelho. As lâminas foram novamente lavadas com PBS (3 vezes por 5 minutos cada). A reação de cores foi detectada com o Vector Immupact DAB (Vector SK-4105) por alguns minutos, verificando ao microscópio, até que a intensidade da coloração estivesse adequada. A reação foi interrompida com água deionizada. As lâminas foram coradas com Hematoxilina por 5 minutos, enxaguadas em água corrente, colocadas em PBS por 5 minutos, enxaguadas com água deionizada, desidratadas em três banhos de álcool a 95% e 2 banhos a 100%, clarificadas em três trocas de xilol, e as lâminas foram então montadas com Entellan (Merck, Rio de Janeiro, RJ).

A imunorreação foi analisada de forma qualitativa e semi-quantitativa de acordo com a intensidade da coloração acastanhada das células e quantidade de células imunomarcadas por campo.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados foram analisados estatisticamente através do *software Bioestat®* (SPSS, Inc., Chicago, IL, EUA). Os dados não-paramétricos foram analisados utilizando o ensaio de *Kruskal-Wallis* seguido do teste de *Dunn*, enquanto ANOVA seguido do teste de *Tukey* foram realizados para os dados paramétricos. Os níveis de significância adotados foram de 5% ($P < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 Ganho de peso e ingestão sólida e líquida

Os grupos que não receberam álcool tiveram maior consumo de comida e água e ganharam mais peso comparados aos grupos alcoólicos, conforme expresso na tabela 2.

Tabela 2 - Valores médios $\pm$ desvio padrão do consumo sólido, consumo líquido e variação de peso dos ratos

Grupo	Ingestão sólida diária/ animal (g)	Ingestão líquida diária/ animal (ml)	Ganho de peso (%)
Controle	22,89 $\pm$ 0,83 ^a	45,79 $\pm$ 4,82 ^a	28,18 $\pm$ 8,26 ^a
Nicotina	21,94 $\pm$ 1,59 ^a	41,28 $\pm$ 2,11 ^a	18,17 $\pm$ 5,70 ^a
Álcool	14,84 $\pm$ 0,74 ^b	29,34 $\pm$ 1,79 ^b	1,09 $\pm$ 7,70 ^b
Álcool + nicotina	13,94 $\pm$ 0,99 ^b	30,58 $\pm$ 0,75 ^b	1,44 $\pm$ 12,48 ^b

Fonte: A autora, 2020.

6.2 Micro-CT

Houve desenvolvimento de lesão periapical em todas as amostras. O grupo Álcool + Nicotina apresentou lesões mais extensas, com maior volume e área, quando comparado aos demais grupos. Os grupos Álcool e Nicotina apresentaram lesões maiores que o grupo controle. Não houve diferença significativa no maior diâmetro da lesão entre os grupos (Tabela 3).

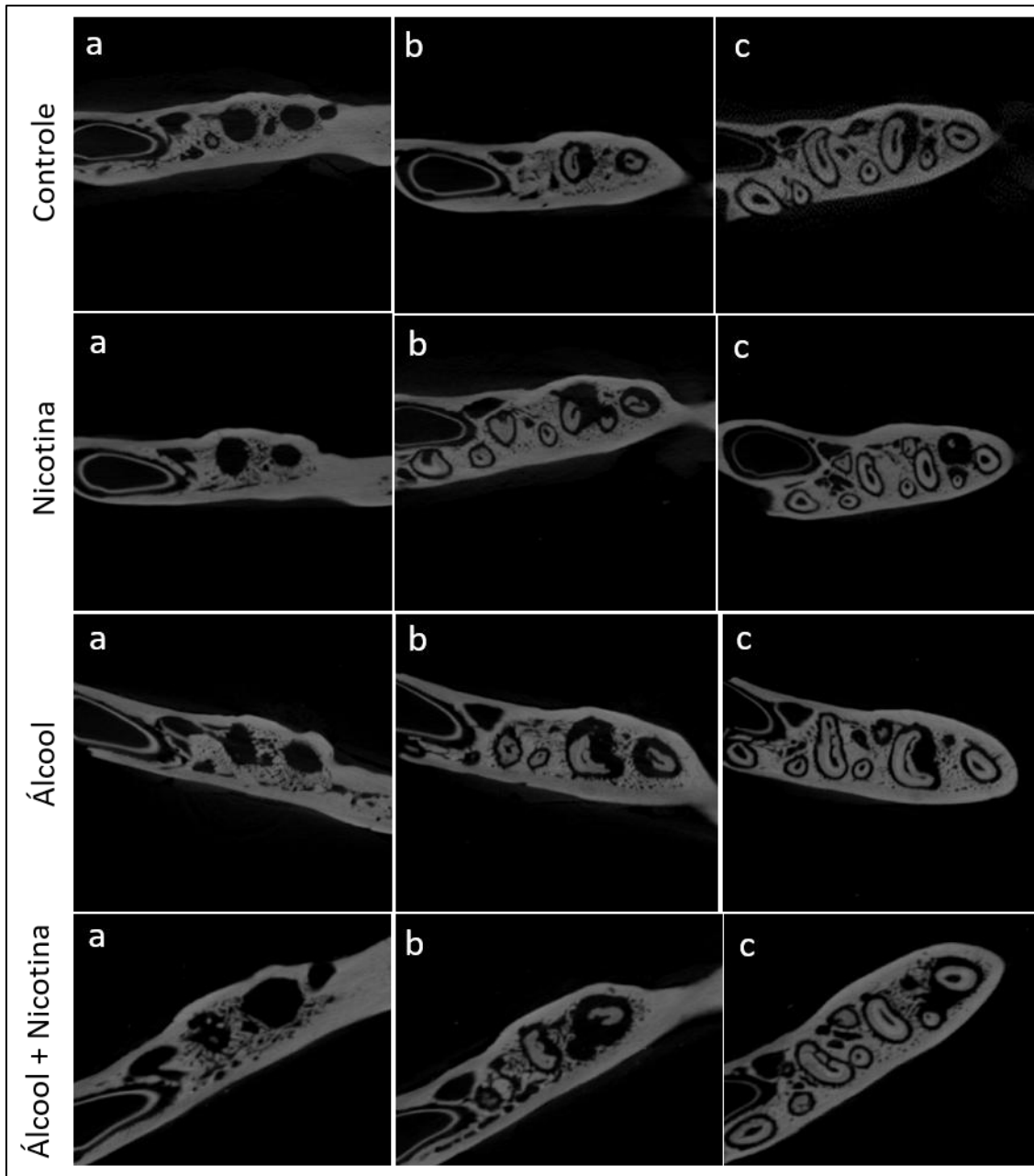
Tabela 3 - Medidas das lesões perirradiculares por análise microtomográfica (média $\pm$ desvio padrão).

Grupo	Volume (mm ³)	Área (mm ²)	Maior diâmetro (mm)
Controle	3,39 $\pm$ 0,61 ^a	50,16 $\pm$ 4,26 ^a	1,58 $\pm$ 0,18 ^a
Nicotina	5,40 $\pm$ 1,27 ^b	64,90 $\pm$ 8,15 ^b	1,60 $\pm$ 0,14 ^a
Álcool	5,89 $\pm$ 1,36 ^b	67,62 $\pm$ 11,47 ^b	1,70 $\pm$ 0,26 ^a
Álcool + nicotina	6,78 $\pm$ 1,32 ^c	80,77 $\pm$ 10,04 ^c	1,83 $\pm$ 0,27 ^a

Fonte: A autora, 2020.

Analisando as imagens pode-se perceber que as margens da lesão periapical nos grupos Controle e Nicotina são mais bem delimitadas, com desenho mais circunscrito e osso mais denso. Já nos grupos submetidos ao álcool, as margens não são bem definidas e o osso se apresenta mais trabelculado (Figura 7).

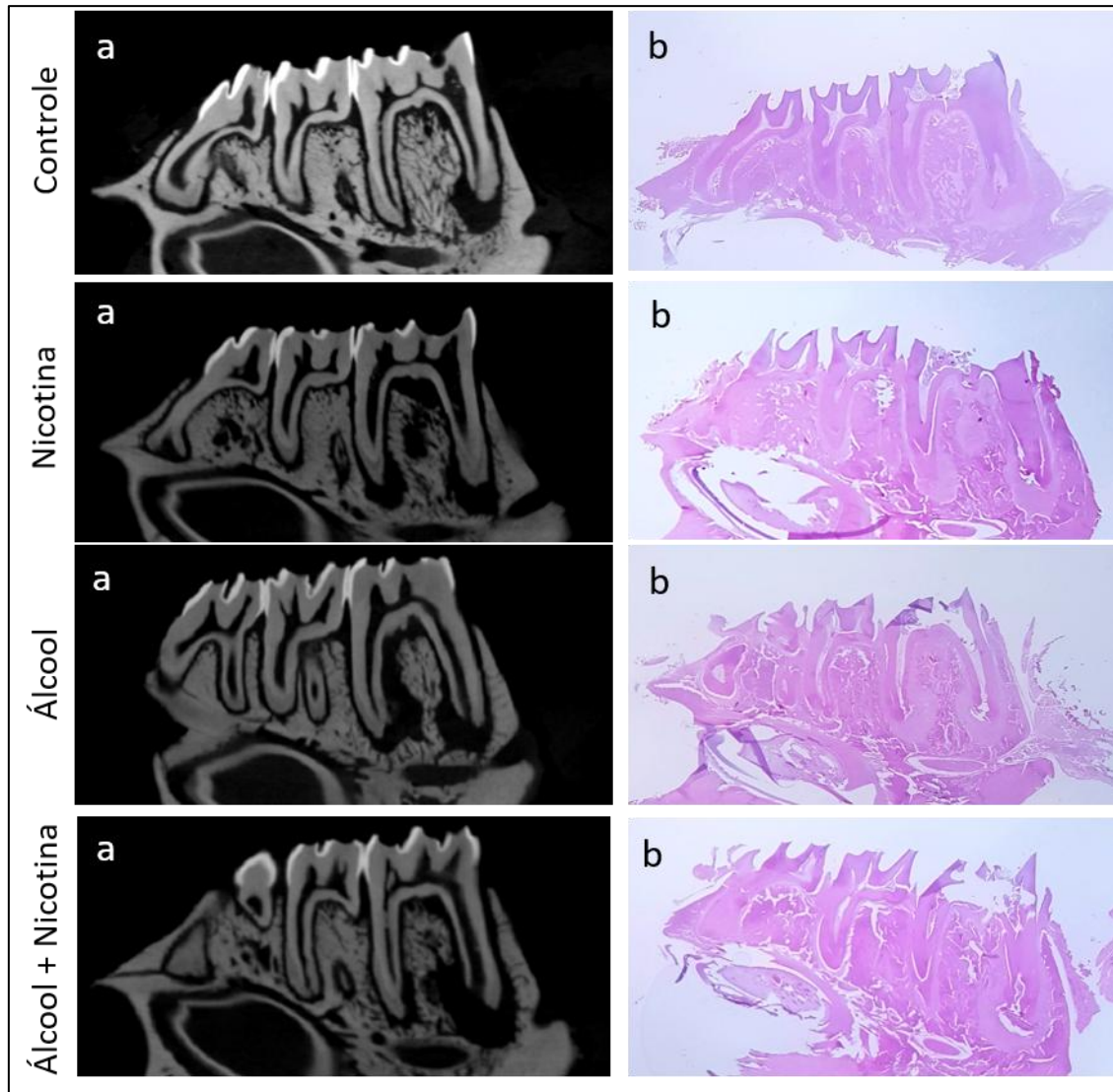
Figura 7 - Imagens da lesão periapical em corte axial



Legenda: (a) Região periapical; (b) Terço apical; (c) Terço médio.

Fonte: A autora, 2020.

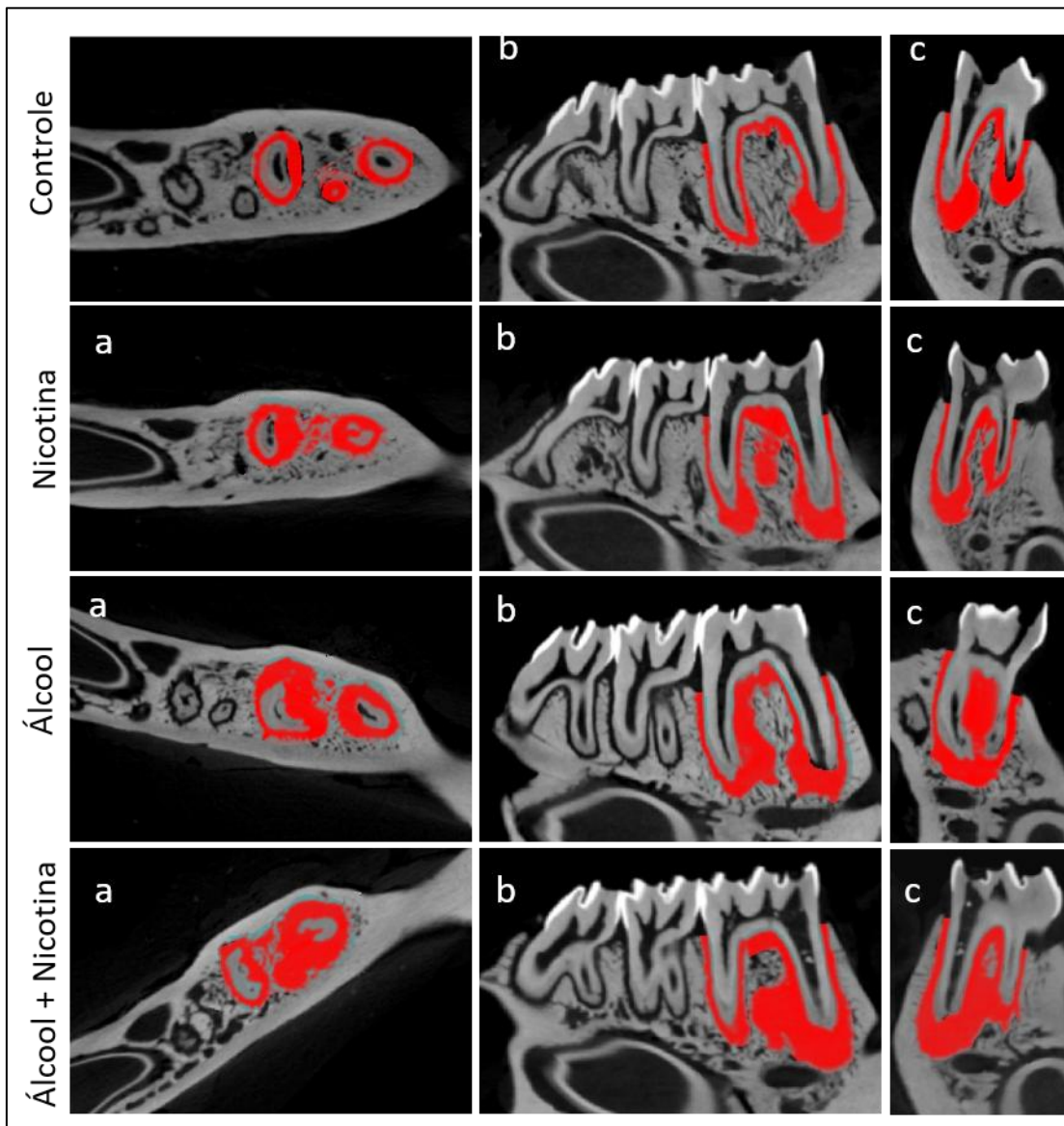
Figura 8 – Corte sagital



Legenda: (a) – Imagem obtida por micro-CT; (b) Fotomicrografia com coloração com hematoxilina e eosina.

Fonte: A autora, 2020.

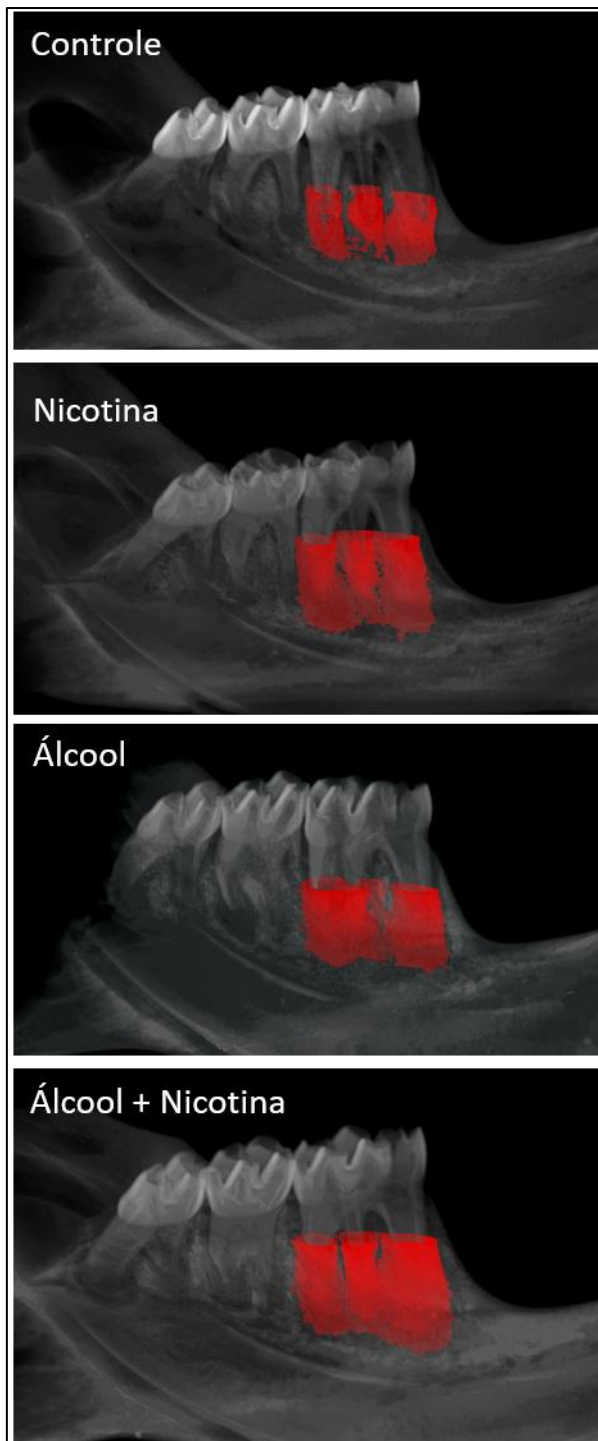
Figura 9 – Imagens de micro-CT com demarcação da lesão



Legenda: (a) – Corte axial; (b) Corte sagital; (c) Corte coronal.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 10 – Imagens tridimensionais



Fonte: A autora, 2020.

6.3 Análise histológica

Em todas as amostras foi observada a presença de infiltrado inflamatório na lesão periapical. Os grupos Nicotina, Álcool e Álcool + Nicotina tiveram infiltrado inflamatório mais intenso e área mais extensa de reabsorção óssea comparados ao grupo Controle (Tabela 4).

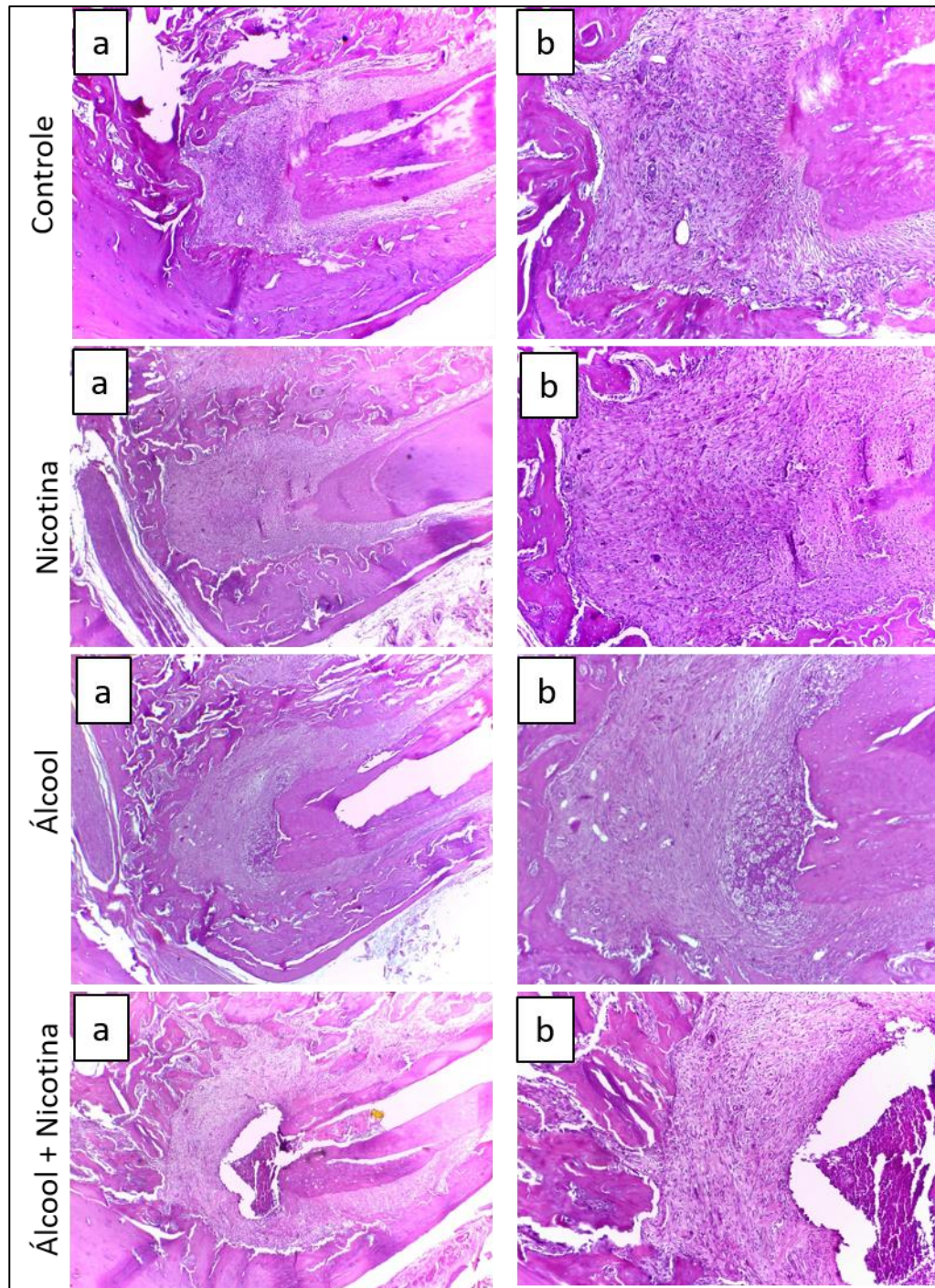
Tabela 4 – Número de espécimes aos quais foram atribuídos os diferentes escores de acordo com a intensidade da resposta inflamatória na avaliação histopatológica.

Grupo	Escore				Mediana
	0	1	2	3	
Controle	0/7	5/7	2/7	0/7	1 ^a
Nicotina	0/7	0/7	5/7	2/7	2 ^b
Álcool	0/7	0/7	5/7	2/7	2 ^b
Álcool + nicotina	0/7	0/7	3/7	4/7	3 ^b

Fonte: A autora, 2020.

Foi observada lesão mais difusa nos grupos experimentais, com predominância de infiltrado inflamatório misto (neutrófilos, macrófagos, linfócitos e plasmócitos) e maiores áreas de necrose nos grupos expostos ao álcool (Figuras 11 e 12).

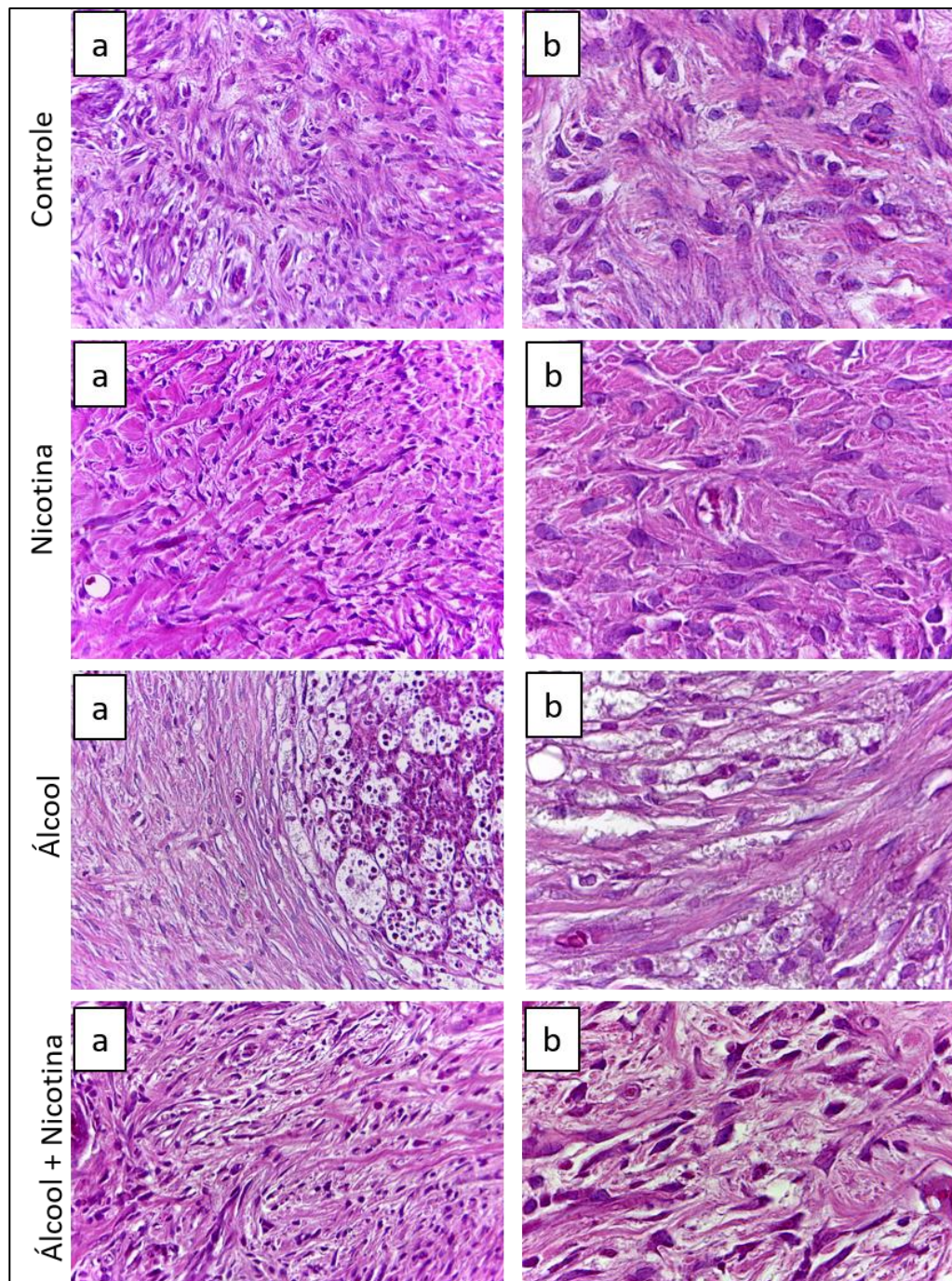
Figura 11 – Fotomicrografias da lesão periapical



Legenda: coloração com Hematoxilina e Eosina: presença de infiltrado inflamatório na região periapical da raiz mesial do primeiro molar acessado. (a) 40x; (b) 100x.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 12 – Fotomicrografias da lesão periapical



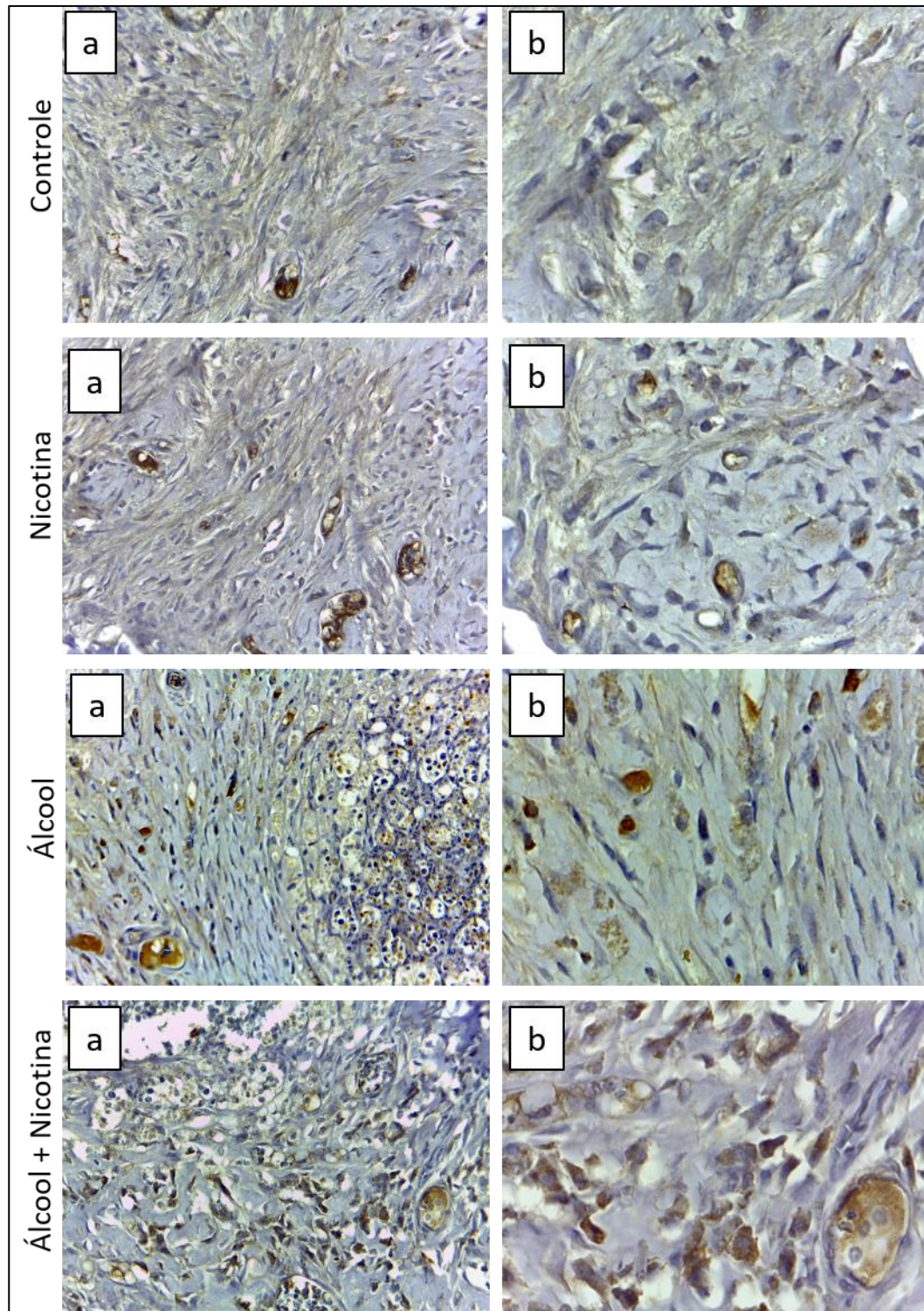
Legenda: coloração com Hematoxilina e Eosina: (a) presença de infiltrado inflamatório em todos os grupos. 400x; (b) infiltrado inflamatório crônico moderado no grupo Controle, com predominância de macrófagos e linfócitos; infiltrado inflamatório misto nos grupos experimentais. 1000x.

Fonte: A autora, 2020.

6.4 Análise imuno-histoquímica

Foi observado um aumento da imunorreatividade para RANKL e PTHrP nos grupos experimentais. Osteoclastos e células progenitoras de osteoclastos apresentaram-se imunomarcadas com coloração moderada à forte, sendo pouco visualizadas no grupo Controle e fortemente expressas nos grupos submetidos ao álcool. (Figuras 13 e 14).

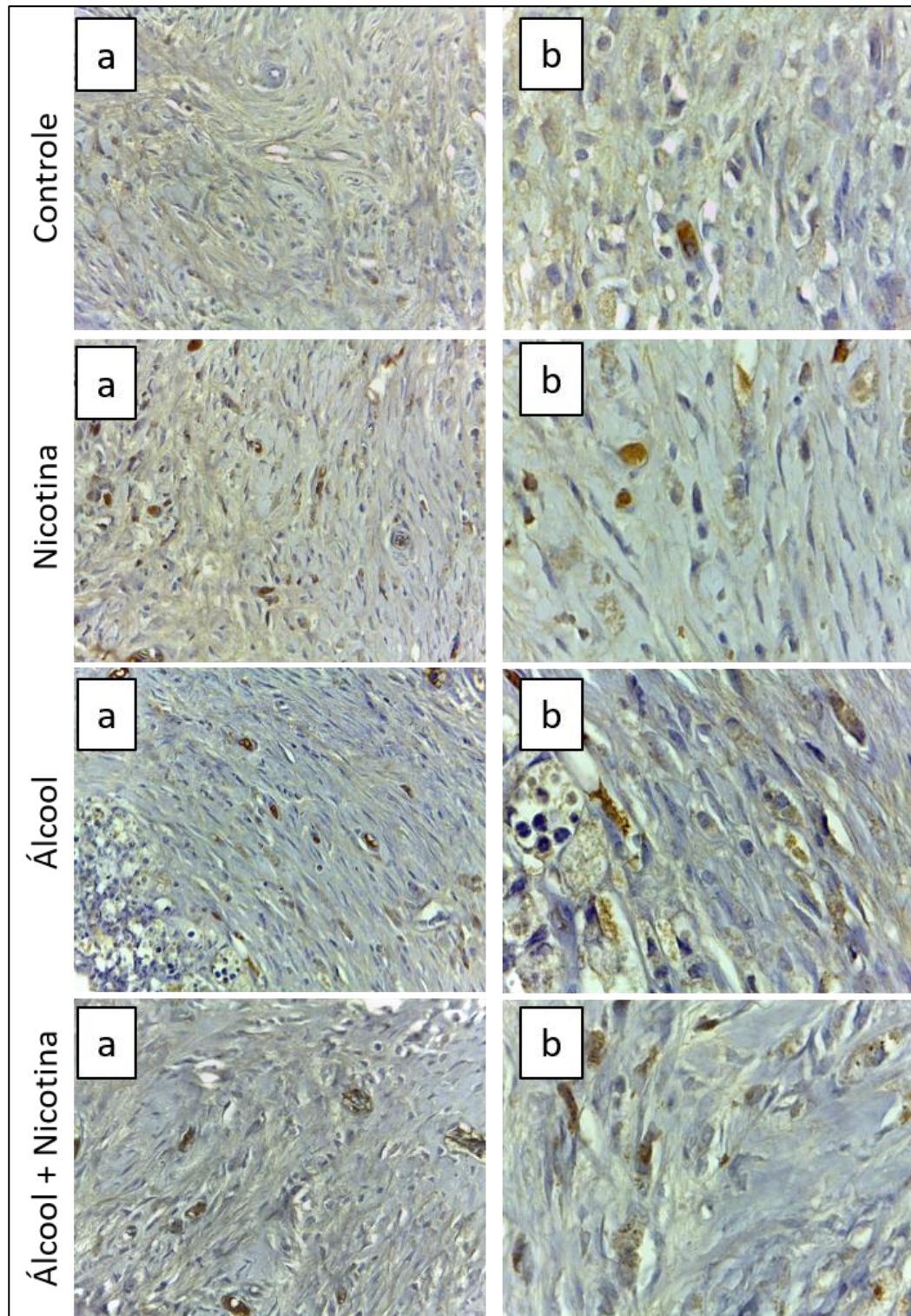
Figura 13 – Fotomicrografias da lesão periapical imunomarcada com anticorpos contra RANKL



Legenda: imunomarcação (coloração acastanhada) de intensidade moderada e forte nos grupos experimentais. (a) 40x; (b) 100x.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 14 – Fotomicrografias da lesão periapical imunomarcada com anticorpos contra PTHrP



Legenda: imunomarcção (coloração acastanhada) de intensidade fraca no grupo controle, e moderada a forte nos grupos experimentais. (a) 400x; (b) 1000x.

Fonte: A autora, 2020.

7 DISCUSSÃO

A influência do consumo crônico de álcool e nicotina no processo de desenvolvimento da lesão periapical tem ganhado atenção, já que este parece induzir um maior comprometimento endodôntico nos pacientes, quando comparado à pacientes não fumantes e alcoolistas (KRALL et al., 2006; LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2012). Para avaliar os mecanismos pelos quais o álcool e a nicotina poderiam interferir na resposta humana, os modelos animais são amplamente sugeridos (COHEN; GEORGE, 2013; FLORECK et al., 2008; MELLO, 1976; SPANAGEL, 2000). Ratos e camundongos têm sido utilizados em estudos para avaliar o desenvolvimento da periodontite apical induzida (JARA et al., 2018; KALATZIS-SOUSA et al., 2017; TRINDADE et al., 2017; YANG et al., 2014). Esses animais apresentam a anatomia de seus incisivos e molares semelhante à dos dentes humanos, assim como a sua microbiota oral, sendo apropriados como modelo patológico para o estudo da lesão periapical (YONEDA et al., 2017).

A relação dose-dependente entre o consumo de álcool e nicotina e sua interferência no processo de remodelação óssea é bem documentada em algumas áreas da Odontologia (LIU et al., 2010; SOUZA et al., 2009). Quanto maior a frequência, intensidade e duração de uso dessas drogas, maiores seus efeitos prejudiciais nos tecidos periodontais de suporte (TOMAR; ASMA, 2000; WARNAKULASURIYA; DIETRICH; BORNSTEIN, 2010). O consumo médio de cigarros no mundo varia entre dez a vinte unidades por dia, com uma média de 14,1 cigarros consumidos/ dia por fumantes no Brasil (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). A administração intraperitoneal diária de 2 µl/ g de peso corporal de solução de nicotina com a concentração de 0,19 µl de nicotina/ ml, dosagem utilizada no presente estudo, equivale à quantidade de nicotina consumida em 15 cigarros, o que mimetiza a condição humana (NOCITI JR. et al., 2000). O período de 28 dias de aplicação da nicotina foi suficiente para observar a sua interferência no tecido ósseo em estudos de indução de periodontite em ratos (DEVECI et al., 2018; LIU et al., 2010). Como até o presente momento não existem estudos avaliando a influência da administração de nicotina no desenvolvimento da lesão periapical em ratos, iniciamos sua aplicação sete dias antes da realização do acesso pulpar, para mimetizar a indução da periodontite apical em um organismo já exposto à nicotina, e a mantivemos pelo período de quatro semanas. Para representar o consumo crônico de álcool, foi utilizada uma solução com concentração de 25% de etanol puro como única fonte de hidratação para os animais, em um período de cinco semanas, além das cinco

semanas de adaptação à dosagem. O aumento da dosagem deve ser progressivo para que os animais não rejeitem a solução. Enquanto a administração de solução contendo até 15% de álcool puro equivale ao consumo alcoólico leve a moderado (LIBERMAN et al., 2011; WAGNER et al., 2016), uma concentração a 20% ou mais representa alto consumo (BASTOS et al., 2014; DAL-FABBRO et al., 2019a; SOUZA et al., 2017). Apesar de cinco semanas parecer um curto período de tempo, devemos considerar que a média de vida dessa espécie de ratos em laboratório é de apenas dois anos, o que comparado à expectativa de vida em humanos, justifica este período de tempo como consumo crônico (D'SOUZA EL-GUINDY et al., 2010).

Outro ponto crucial para estabelecer o período total do experimento é o período de tempo de exposição pulpar para indução da lesão. Em 14 dias já pode-se observar, por meio de radiografias, lesão radiolúcida bem definida em ratos (PINTO, 2006). Em períodos mais prolongados, como sessenta, noventa ou cento e vinte dias, a destruição óssea começa a ser muito extensa, atrapalhando a medição da lesão periapical (PINTO, 2006; XU et al., 2019). Por isso, no presente estudo, estabelecemos o período de 28 dias, também utilizado em outros estudos de indução de lesão periapical (AKSOY et al., 2019; XU et al., 2019). Observamos que quatro semanas de exposição pulpar foi suficiente para gerar uma lesão extensa, porém preservando ainda as margens ósseas, permitindo sua medição e comparação entre os grupos.

Existem inúmeros mecanismos passíveis de aplicação do álcool e da nicotina em pequenos animais. Para simular o tabagismo, é comum a utilização de câmaras de fumaça, onde os ratos são expostos à fumaça emitida por cigarros (YPSILANTIS et al., 2012). O cigarro pode apresentar mais de 4 mil componentes ativos em sua formulação, e muitas destas substâncias podem causar alterações no metabolismo ósseo, como a nicotina, o alcatrão, o arsênio e acetaldeídos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (US), 2010; FOWLES; BATES, 2000; HERNIGOU; SCHUIND, 2019). A nicotina é o principal constituinte ativo do cigarro e tem sido amplamente utilizada nos estudos de desenvolvimento de periodontite (DEVECI et al., 2018; KUBOTA; YANAGITA; MORI, 2016; LIU et al., 2010; NOCITI et al., 2000). Devido as inúmeras formulações de cigarros disponíveis, e com a proposta de analisar a influência de uma droga específica às alterações na lesão periapical, neste estudo também escolhemos utilizar apenas a nicotina. Essa substância pode ser aplicada por injeção subcutânea, por meio de um dispositivo subcutâneo de liberação contínua ou por injeção intraperitoneal (MATTA et al., 2007). Os métodos subcutâneos permitem a aplicação de uma dosagem maior com menores riscos ao animal, sendo considerados mais seguros (LEVIN-ARAMA et al., 2016). Porém, a lenta absorção leva a uma biodisponibilidade

incompleta da droga, e até a mesma ser absorvida pelo organismo há uma perda da quantidade inicialmente administrada (RICHTER; BHANSALI; MORRIS, 2012). Por isso, no presente estudo, escolhemos a utilização da injeção intraperitoneal. Este tipo de aplicação oferece maiores riscos, como a perfuração de órgãos abdominais, mas permite uma absorção quase instantânea, atingindo rapidamente a circulação sanguínea (LUKAS; BRINDLE; GREENGARD, 1971). Além disso, profissionais treinados podem realizar o procedimento de forma simples e segura, reduzindo o risco de complicações (TURNER et al., 2011). Em relação ao álcool, a administração comumente é feita através de gavagem, pela dieta calórica de *Lieber DeCarli* ou por administração através de livre consumo. A gavagem consiste na introdução da solução alcoólica diretamente no esôfago do animal através de uma cânula (ARANTES-RODRIGUES et al., 2012). Além do consumo da droga ocorrer em grande dosagem de uma só vez, este procedimento é altamente estressante ao animal quando realizado repetidamente, sendo mais recomendado para aplicações únicas (ARANTES-RODRIGUES et al., 2012; BROWN et al., 2002). A dieta *Lieber DeCarli*, uma mistura que consiste em álcool e quantidade de calorias e proteínas necessárias diariamente ao animal, é amplamente utilizada, porém restringe o consumo sólido de comida, e assim, não simula o consumo de álcool como ocorre em humanos (D'SOUZA EL-GUINDY et al., 2010; LIEBER, 2003). Portanto, o consumo espontâneo foi utilizado neste estudo, já que este oferece as características mais semelhantes ao consumo humano, além de permitir a avaliação do estado nutricional fisiológico dos animais (PLANETA, 2013).

No presente estudo, os ratos submetidos ao consumo de álcool ingeriram menos comida e ganharam menos peso, quando comparados aos animais não submetidos ao álcool ($P < 0,05$). Devido ao seu alto valor calórico (7,1 kcal/g), os animais que receberam álcool provavelmente se sentiram satisfeitos e, portanto, se alimentaram menos (D'SOUZA EL-GUINDY et al., 2010). Como a alta ingestão de álcool acaba privando o consumo de diversos nutrientes, além de gerar má absorção de proteínas e vitaminas, ocorre uma desnutrição secundária ao alcoolismo (LIEBER et al., 2000; 2003). Essa desnutrição pode levar à alterações no desenvolvimento ósseo e resposta inflamatória, levando ao aumento da atividade osteoclástica, perda óssea, e má cicatrização óssea (RIZZOLI; BONJOUR, 1999). Isso explicaria nossos achados, em que os grupos submetidos ao álcool apresentaram maior reabsorção óssea periapical quando comparados ao grupo controle ($P < 0,05$). Portanto, a má nutrição pode ser um fator de risco indireto do consumo excessivo de álcool, podendo interferir no processo de osteoclastogênese, e assim, no desenvolvimento da lesão periapical.

Em nosso estudo, a hipótese nula (H_0) foi rejeitada, já que houve diferença significativa nas aferições do tamanho da lesão periapical por micro-CT, na resposta inflamatória através da análise histopatológica e na expressão dos marcadores de atividade osteoclástica, entre os grupos experimentais e controle ($P < 0,05$). A micro-CT é hoje o melhor método de diagnóstico por imagem, amplamente utilizado em estudos em ratos (KALATZIS-SOUSA et al., 2017). A avaliação por radiografias não refletem a real extensão do processo destrutivo nos tecidos periapicais e geralmente sub-representam o tamanho da lesão (FERREIRA et al., 2006). A micro-CT proporciona imagens em alta resolução que permitem a avaliação de lesões periapicais em diferentes planos (CAVANAUGH et al., 2004; VON STECHOW et al., 2003), sendo considerada um importante método diagnóstico para estudos em modelos animais (SCHAMBACH et al. 2010). Essa técnica tem sido amplamente utilizada para avaliação da periodontite apical em ratos (DE OLIVEIRA et al., 2015; KANG et al., 2013, XU et al., 2019; YANG et al., 2014), principalmente para obtenção dos valores quantitativos de área e volume da lesão (KANG et al., 2013; YANG et al., 2014). As imagens da destruição óssea periapical obtidas pela micro-CT provém resultados equivalentes aos observados por meio da histologia, que é considerada o padrão-ouro para avaliação da periodontite apical (BALTO et al., 2000; VON STECHOW et al., 2003). Nossos achados corroboram com isso, já que observamos que as imagens obtidas por meio da micro-CT mostram-se extremamente semelhantes à extensão do processo inflamatório observado nas lâminas histopatológicas. No entanto, existe informação limitada na literatura acerca de um protocolo padronizado dos parâmetros para aquisição, reconstrução e análise de lesões periapicais em ratos utilizando a micro-CT. A falta de padronização pode levar à obtenção de medidas inapropriadas, comprometendo seu impacto científico (KALATZIS-SOUSA et al., 2017). O principal fator a ser considerado na análise das lesões periapicais em imagens de micro-CT é a seleção da região de interesse (ROI) a ser avaliada. É comum a utilização de demarcações automáticas ou elípticas nos estudos (DE OLIVEIRA et al., 2015; SUN; WANG; PENG, 2014; YANG et al., 2014), contudo, a utilização de ROIs não personalizados resulta na inclusão de áreas que não são parte da lesão periapical, como ligamento periodontal de dentes adjacentes, polpa radicular e regiões medulares do osso (KALATZIS-SOUSA et al., 2017). ROIs personalizados permitem a delimitação manual da lesão periapical e promovem medidas mais acuradas (KALATZIS-SOUSA et al., 2017). Em nosso estudo, a marcação do ROI foi realizada de forma personalizada, com a seleção incluindo apenas a lesão e o ligamento periodontal do dente avaliado, excluindo áreas de canal radicular e ligamento periodontal de dentes adjacentes.

No presente estudo, os grupos experimentais apresentaram uma maior reabsorção óssea periapical, com lesões de maior área e volume, quando comparados ao grupo controle ($P < 0,05$). Além disso, o grupo com consumo simultâneo de álcool e nicotina apresentou lesões mais destrutivas do que os grupos submetidos apenas ao álcool ou à nicotina ($P < 0,05$). Esses resultados parecem consistentes com estudos prévios de indução de periodontite, que mostram maior destruição óssea alveolar em ratos submetidos ao consumo crônico de álcool (NOGUEIRA-FILHO et al., 2004; SOUZA et al., 2006, 2009, 2017) ou nicotina (LIU et al., 2010; NOCITI JR. et al., 2000). A nicotina reduz o suprimento sanguíneo, restringindo a chegada de nutrientes e oxigenação no tecido local, além de alterar a síntese de colágeno pelos fibroblastos, acelerando a perda óssea (SEGURA-EGEA; MARTIN-GONZALES; CASTELLANOS-COSANO, 2015). Por sua vez, o consumo crônico de álcool gera um desequilíbrio no processo de remodelação óssea, alterando a microarquitetura do osso (MAUREL et al., 2012). Ocorre redução da espessura e volume ósseos e aumento da erosão da sua superfície (MAUREL et al., 2012). Este fato também foi observado no presente estudo pela análise visual das imagens de micro-CT dos grupos submetidos ao álcool, onde foi observada maior erosão óssea, com osso apresentando um aspecto mais poroso. Até o momento, nenhum estudo avaliou os efeitos do consumo simultâneo de álcool e nicotina no desenvolvimento de periodontite apical. Nossos achados corroboram com um estudo que avaliou o desenvolvimento de periodontite em ratos submetidos também às concentrações de 25% de álcool e 0,19 µl de nicotina (PEREIRA VASCONCELOS et al., 2013). Os autores observaram que o consumo simultâneo das duas substâncias intensificou seus efeitos e levou a uma maior perda óssea do que os grupos expostos apenas à uma das drogas. O consumo simultâneo de álcool e nicotina tem ação sinérgica intensificando seus efeitos prejudiciais ao metabolismo ósseo (PEREIRA VASCONCELOS et al., 2013).

A avaliação da reabsorção óssea periapical deve ser validada por meio de análise histológica (SUN; WANG; PENG, 2014; VON STECHOW et al., 2003). Estudos prévios revelam a capacidade do consumo crônico de álcool e nicotina em alterar a expressão de mediadores químicos como citocinas pró-inflamatórias, em regiões de periodontite e periodontite apical (SEGURA-EGEA; MARTIN-GONZALES; CASTELLANOS-COSANO, 2015; TURNER, 2011). Isso explicaria a resposta inflamatória aumentada observada nos grupos experimentais neste estudo ($P < 0,05$), com presença de um infiltrado inflamatório mais extenso e maior área de destruição óssea periapical. Esses achados indicam que o consumo de álcool e nicotina induz o aumento da resposta inflamatória durante o desenvolvimento da periodontite apical. O consumo crônico de álcool já foi associado à exacerbação da resposta

inflamatória em periodontite (IRIE et al., 2008) e periodontite apical (DAL-FABBRO et al., 2019a, 2019b, 2019c) induzidas em ratos. O tabagismo também pode induzir uma forte reação inflamatória, liberando substâncias degradadoras de tecido como collagenases, proteases e citocinas pró-inflamatórias (PALMER et al., 1999). A avaliação histológica da influência da nicotina no aparato periodontal de ratos também observou maior proliferação de células inflamatórias, além de aumento da atividade angiogênica, degeneração celular e alterações na síntese de colágeno (DEVECI et al., 2018).

O presente estudo revelou uma maior imunexpressão dos biomarcadores de atividade osteoclastogênica RANKL e PThRP nos grupos experimentais, em comparação ao grupo controle, consistente com estudos prévios que mostram uma maior expressão dos marcadores de osteoclastogênese em ratos expostos à nicotina (KUBOT; YANAGITA; MORI, 2016) e ao álcool (CALLACI et al., 2009; DAL-FABBRO et al., 2019b, 2019c). RANKL e PTHrP funcionam como biomarcadores de metabolismo ósseo (KUMAMOTO; OOYA, 2004) e podem ser utilizados para observar o aumento da atividade osteoclástica. Durante o processo de inflamação periapical, citocinas são expressas iniciando uma cascata de ativação de osteoclastos através da via RANK/RANKL e OPG, o que leva ao aumento do processo de osteoclastogênese (HOFBAUER; SCHOPPET, 2004). RANK e RANKL são marcadores positivos de atividade osteoclástica, enquanto OPG é um marcador negativo. Como o PTHrP aumenta a produção de RANKL e inibe a ação do OPG, também pode ser considerado um marcador positivo do aumento da reabsorção óssea.

Todos estes achados sugerem que mais atenção clínica deveria ser direcionada ao prognóstico do tratamento endodôntico em pacientes alcoólatras e fumantes, pela provável necessidade de maior tempo de reparo ósseo da lesão. Além disso, seria importante que os profissionais conscientizassem os seus pacientes sobre os possíveis efeitos deletérios do alcoolismo e do tabagismo no desenvolvimento da doença periapical.

Outros estudos se fazem necessários para um melhor entendimento do processo através do qual o consumo de álcool e nicotina interfere no desenvolvimento da periodontite apical, como a avaliação de citocinas e a utilização de diferentes concentrações de ambas as drogas para avaliar o potencial de sua ação dose-dependente.

CONCLUSÃO

O consumo crônico de álcool e nicotina contribuiu para o aumento da severidade da periodontite apical devido à exacerbação da resposta inflamatória, potencializando o processo de osteoclastogênese. Além disso, a associação das duas substâncias parece potencializar seus efeitos prejudiciais.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, D.P. Cardio protective effects of light–moderate consumption of alcohol: a review of putative mechanisms. **Alcohol and Alcoholism**, v. 37, n. 5, p. 409–415, 2002.
- AKSOY, U.; SAVTEKIN, G.; SEHIRLI, A. Ö.; *et al.* Effects of alpha-lipoic acid therapy on experimentally induced apical periodontitis: a biochemical, histopathological and micro-CT analysis. **Int Endod J.**, v. 52, n. 9, p. 1317-1326, 2019.
- ALBANDAR J. M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. **Periodontology** **2000**, v. 29, p. 177–206, 2002.
- AL-NAZHAN S.A.; ALSAEED S.A.; AL-ATTAS H.A.; *et al.* Prevalence of apical periodontitis and quality of root canal treatment in an adult Saudi population. **Saudi Med J**, v. 38, n. 4, p. 10, 2017.
- AMARAL C.S.F.; LUIZ R.R.; LEÃO A.T.T. The Relationship Between Alcohol Dependence and Periodontal Disease. **J Periodontol**, v, 79, n. 6, p. 993-998, 2008.
- ARANTES-RODRIGUES, R.; HENRIQUES, A.; PINTO-LEITE, R.; *et al.* The effects of repeated oral gavage on the health of male CD-1 mice. **Lab Anim**, v. 41, p. 129–134, 2012.
- BALTO K.; MEÜLLER R.; CARRINGTON D.C.; *et al.* Quantification of periapical bone destruction in mice by micro-computed tomography. **Journal of Dental Research**, v. 79, p. 35–40, 2000.
- BARREIROS, D.; PUCINELLI, C. M.; DE OLIVEIRA, K. M. H.; *et al.* Immunohistochemical and mRNA expression of RANK, RANKL, OPG, TLR2 and MyD88 during apical periodontitis progression in mice. **Journal of Applied Oral Science**, v. 26, e20170512, 2018.
- BASTOS M.F.; GAAG G.L.; ROMERO J.R.; *et al.* Effects of Cachaça, a typical Brazilian alcoholic beverage, on alveolar bone loss and density: a study in peripubertal rats. **Arch Oral Biol.**, v. 59, n. 1, p. 82-91, 2014.
- BERGSTROEM J.; BABCAN J.; ELIASSON S. Tobacco smoking and dental periapical condition. **Eur J Oral Sci**, v.112, p. 115–120, 2004.
- BOABAID F.; BERRY J.E.; KOH A.J.; *et al.* The role of parathyroid hormone-related protein in the regulation of osteoclastogenesis by cementoblasts. **J Periodontol.**, v. 75, n. 9, p. 1247-54, 2004.
- BOYCE, B.F.; XING, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. **Arthritis Res Ther**, v. 9, S1, 2007.
- BOYLE W.J.; SIMONET W.S.; LACEY D.L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, p. 337–342, 2003.

BROWN E.C.; PERRIEN D.S.; FLETCHER T.W.; *et al.* Skeletal toxicity associated with chronic ethanol exposure in a rat model using total enteral nutrition. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 301, p. 1132-8, 2002.

BUKMIR R.P.; GRGIĆ M.J.; BRUMINI, G. Influence of tobacco smoking on dental periapical condition in a sample of Croatian adults. **Wien Klin Wochenschr**, v. 128, p. 260, 2016.

CALLACI J.J.; HIMES R.; LAUING K.; *et al.* Binge alcohol-induced bone damage is accompanied by differential expression of bone remodeling-related genes in rat vertebral bone. **Calcif Tissue Int**, v. 84, p. 474-84, 2009.

CAVANAUGH D.; JOHNSON E.; PRICE R.E.; *et al.* In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models. **Molecular Imaging**, v. 3, p. 55-62, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (US). How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA), 2010.

CHAKKALAKAL D.A. Alcohol-Induced Bone Loss and Deficient Bone Repair. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 29, n. 12, p. 2077-2090, 2005.

CHEN W.J.; PARNELL S.E.; WEST J.R. Nicotine decreases blood alcohol concentration in neonatal rats. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 25, p. 1072-1077, 2001.

CHEUNG R.C.; GRAY C.; BOYDE A.; JONES S.J. Effects of ethanol on bone cells in vitro resulting in increased resorption. **Bone**, v. 16, p. 143-7, 1995.

COHEN A.; GEORGE O. Animal models of nicotine exposure: relevance to second-hand smoking, electronic cigarette use, and compulsive smoking. **Frontiers in Psychiatry**, v. 4, p. 41, 2013.

COSTA-RODRIGUES J.; ROCHA I.; FERNANDES M.H. Complex osteoclastogenic inductive effects of nicotine over hydroxyapatite. **J Cell Physiol.**, v. 233, n. 2, p. 1029-40, 2018.

COWAN R. W., SINGH G., GHERT M. PTHrP Increases RANKL Expression by Stromal Cells from Giant Cell Tumor of Bone. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 30, n. 6, p. 877-84, 2012.

DAI J.; LIN D.; ZHANG J.; HABIB P.; *et al.* Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. **Clin Invest**, v. 106, n. 7, p. 887-895, 2000.

DAL-FABBRO, R.; MARQUES DE ALMEIDA, M.; COSME-SILVA, L.; *et al.* Chronic alcohol consumption changes blood marker profile and bone density in rats with apical periodontitis. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 10, n. 3, e12418, 2019a.

DAL-FABBRO, R., MARQUES-DE-ALMEIDA, M., COSME-SILVA, L.; *et al.* Chronic alcohol consumption increases inflammation and osteoclastogenesis in apical periodontitis. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 3, 2019b.

DAL-FABBRO, R.; MARQUES DE ALMEIDA, M.; COSME-SILVA, L.; *et al.* G. Effects of different alcohol concentrations on the development of apical periodontitis in rats. **Archives of Oral Biology**, 108, 104538, 2019c.

DANTAS A.M.; MOHN C.E.; BURDET B.; *et al.* Ethanol consumption enhances periodontal inflammatory markers in rats. **Arch Oral Biol.**, v. 57, n. 9, p. 1211-1217, 2012.

DE OLIVEIRA K.M.; SILVA R.A.; K€UCHLER E.C.; *et al.* Correlation between histomorphometric and micro-computed tomography analysis of periapical lesions in mice model. **Ultrastructural Pathology**, v. 8, p. 1–5, 2015.

DE ROSSI A.; SILVA L.A.B.; LEONARDO M.R.; *et al.* Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 99, p. 628-636, 2005.

DEVECI B.; AYNÄ B.; TACIR I.H.; *et al.* Effects of nicotine administration in rats on MMP2 and VEGF levels in periodontal membrane. **Folia Morphol**, v. 77, n. 3, p. 471-477, 2018.

D'SOUZA EL-GUINDY N.B.; KOVACS E.J.; DE WITTE P.; *et al.* Laboratory models available to study alcohol-induced organ damage and immune variations: choosing the appropriate model. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, v. 34, p. 1489-511, 2010.

DIAMOND T.; STIEL D.; LUNZER M.; *et al.* Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. **Am J Med**, v. 86, p. 282–288, 1989.

DIAZ L.E.; MONTERO A.; GONZALEZ-GROSS M.; *et al.* Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. **Eur J Clin Nutr**, v. 56, n. 3, p. 50-53, 2002.

DUVILLARD S.P.; SINZINGER H.; BERENT R. Influence of cigarette smoking on synthesis of eicosanoids, isoprostanes and lipoxygenase metabolites in apical periodontitis. **Arch Oral Biol.**, v. 57, n. 8, p. 1133-40, 2012.

EDER A.; KOEGL E.; VON SGAN-COHEN H.D.; *et al.* Trends in caries and associated variables among young israeli adults over 5 decades. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 28, p. 234–40, 2000.

ELKIND M.S.; SCIACCA R.; BODEN-COSTANZO S.; *et al.* Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis. **Eur J Epidemiol**, v. 26, p. 833- 850, 2011.

ELMALI N.; ERTEM K.; OZEN S; *et al.* Fracture healing and bone mass in rats fed on liquid diet containing ethanol. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 26, p. 509–513, 2002.

FERREIRA F.F.; CAMPOS RABANG H.R.; PINHEIRO E.T.; *et al.* Root canal microbiota of dogs' teeth with periapical lesions induced by two different methods. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, p. 564-567, 2006.

FLOREK E.; PIEKOSZEWSKI W.; KULZA M.; *et al.* Interaction between tobacco smoke and alcohol in animal models. **Pharmacological Reports**, v 60, p. 985-90, 2008.

FOWLES J., BATES M. The Chemical Constituents in Cigarettes and Cigarette Smoke: Priorities for Harm Reduction. A Report to the New Zealand Ministry of Health Epidemiology and Toxicology Group. ESR: Kenepuru Science Centre PO Box 50-348, Porirua, New Zealand, 2000.

FRIDAY K.E.; HOWARD G.A. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. **Metabolism**, v. 40, p. 562–565, 1991.

GADDINI G.W.; TURNER R.T.; GRANT K.A.; IWANIEC U.T. Alcohol: A Simple Nutrient with Complex Actions on Bone in the Adult Skeleton. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 40, n. 4, p. 657–671, 2016.

GALINDO-MORENO P.; FAURI M.; ÁVILA-ORTIZ G.; *et al.* Influence of alcohol and tobacco habits on peri-implant marginal bone loss: A prospective study. **Clin Oral Implants Res**, v. 16, p. 579–586, 2005.

GANRY O.; BAUDOIN C.; FARDELLONE P. Effect of alcohol intake on bone mineral density in elderly women: the EPIDOS Study. *Epidemiologie de l'Osteoporose*. **Am J Epidemiol**, v. 151, p. 773–780, 2000.

GOMES-FILHO, J.E.; WAYAMA, M.T.; DORNELLES, R.C.; *et al.* Effect of raloxifene on periapical lesions in ovariectomized rats. **Journal of Endodontics**, v. 41, p. 671-675, 2015.

HERNIGOU, J.; SCHUIND, F. Tobacco and bone fractures: A review of the facts and issues that every orthopaedic surgeon should know. **Bone & Joint Research**, v. 8, n. 6, p. 255–265, 2019.

HOFBAUER L.C.; SCHOPPET M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. **JAMA**. v. 292, n. 4, p. 490-5, 2004.

HUANG R.; LI M.; GREGORY R.L.; Effect of nicotine on growth and metabolism of *Streptococcus mutans*. **Eur J Oral Sci**, v 120, p. 319–325, 2012.

IRIE K.; TOMOFUJI T.; TAMAKI N.; *et al.* Okayama Effects of Ethanol Consumption on Periodontal Inflammation. **J Dent Res**, v. 87, n. 5, p. 456-460, 2008.

JARA C.M.; HARTMANN R.C.; BÖTTCHER D.E.; *et al.* Influence of apical enlargement on the repair of apical periodontitis in rats. **Int Endod J**, v. 51, n. 11, p. 1261-1270, 2018.

JARUGA B.; HONG F.; KIM W.H.; *et al.* Chronic alcohol consumption accelerates liver injury in T cell-mediated hepatitis: alcohol dysregulation of NF-kappaB and STAT3 signaling pathways. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 287, p. 471-479, 2004.

JOHNSON G.K.; SLACH N.A. Impact of tobacco use on periodontal status. **J Dent Educ**, v. 65, n. 4, p. 313-21, 2001.

JUGDAOHSINGH R.; O'CONNELL M.A.; SRIPANYAKORN S.; POWELL J.J. Moderate alcohol consumption and increased bone mineral density: potential ethanol and non-ethanol mechanisms. **Proc Nutr Soc**, v. 65, p. 291-310, 2006.

KALATZIS-SOUSA N. G.; SPIN-NETO R.; WENZEL A.; *et al.* Use of micro-computed tomography for the assessment of periapical lesions in small rodents: a systematic review. **International Endodontic Journal**, v. 50, p. 352-366, 2017.

KANG B.; CHEONG S.; CHAICHANASAKUL T.; *et al.* Periapical disease and bisphosphonates induce osteonecrosis of the jaws in mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, p. 1631-40, 2013.

KIRKEVANG L-L.; WENZEL A. Risk indicators for apical periodontitis. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 31, p. 59-67, 2003.

KIRSCHNECK C.; PROFF P.; MAURER M. Orthodontic forces add to nicotine-induced loss of periodontal bone: An in vivo and in vitro study. **J Orofac Orthop**, v. 76, n. 3, p. 195-212, 2015.

KIRSCHNECK C.; MAURER M.; WOLF M.; *et al.* Regular nicotine intake increased tooth movement velocity, osteoclastogenesis and orthodontically induced dental root resorptions in a rat model. **Int J Oral Sci.**, v. 9, n. 3, p. 174-184, 2017.

KRALL E.A.; ABREU SOSA C.; GARCIA C.; *et al.* Cigarette smoking increases the risk of root canal treatment. **J Dent Res**, v. 85, n. 4, p. 313-317, 2006.

KUBOTA M.; YANAGITA M.; MORI K. The effects of cigarette smoke condensate and nicotine on periodontal tissue in a periodontitis model mouse. **PLoS One**; v. 11, n. 5, p.e0155594, 2016.

KUMAMOTO H.; OOYA K. Expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP), osteoclast differentiation factor (ODF)/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) and osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF)/osteoprotegerin (OPG) in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med.**, v. 33, n. 1, p. 46-52, 2004.

LACEY D.L.; TIMMS E.; TAN H.L.; *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, v. 93, p. 165-76, 1998.

LAITINEN K.; LAMBERG-ALLARDT C.; TUNNINEN R.; *et al.* Bone mineral density and abstinence-induced changes in bone and mineral metabolism in noncirrhotic male alcoholics. **Am J Med**, v. 93, p. 642-650, 1992.

LAUING K.; HIMES R.; RACHWALSKI M.; *et al.* Binge alcohol treatment of adolescent rats followed by alcohol abstinence is associated with site-specific differences in bone loss and incomplete recovery of bone mass and strength. **Alcohol**, v. 42, p. 649–656, 2008.

LEE M.; CHOI Y-H.; SAGONG J.; *et al.* The interactive association of smoking and drinking levels with presence of periodontitis in South Korean adults. **BMC Oral Health**, v. 16, n. 1, p. 80, 2016.

LEVIN-ARAMA M.; ABRAHAM L.; WANER, T.; *et al.* Subcutaneous Compared with Intraperitoneal Ketamine–Xylazine for Anesthesia of Mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 55, n. 6, p. 794–800, 2016.

LIBERMAN D.N.; PILAU R.M.; GAIO E.J.; *et al.* Low concentration alcohol intake may inhibit spontaneous alveolar bone loss in Wistar rats. **Arch Oral Biol**, v. 56, p. 109–113, 2011.

LIEBER C.S. Alcohol and the liver: metabolism of alcohol and its role in hepatic and extrahepatic diseases. **Mt Sinai J Med**, v. 67, p. 84–94, 2000.

LIEBER C.S. Relationships between nutrition, alcohol use, and liver disease. **Alcohol Res Health**, v. 27, p. 220–31, 2003.

LINDHOLM J.; STEINICHE T.; RASMUSSEN E.; *et al.* Bone disorder in men with chronic alcoholism: a reversible disease? **J Clin Endocrinol Metab**, v. 73, p. 118–124, 1991.

LIU Y-F.; WU L-A.; WANG J.; *et al.* Micro-computerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature- and nicotine-induced experimental periodontitis in rats. **J Periodont Res**, v. 45, p. 714–719, 2010.

LÓPEZ-LÓPEZ J.; JANÉ-SALAS E.; MARTÍN-GONZÁLEZ J.; *et al.* Tobacco smoking and radiographic periapical status: a retrospective case-control study. **PAJ Endod**, v. 38, n. 5, p. 584–8, 2012.

LUKAS, G.; BRINDLE, S. D.; GREENGARD P. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 178, n. 3, p. 562–566, 1971.

MALHOTRA R.; KAPOOR A.; GROVER V. Nicotine and periodontal tissues. **J Indian Soc Periodontol**, v. 14, n. 1, p. 72–79, 2001.

MARQUES-VIDAL P.; BOCHUD M.; BASTARDOT F.; *et al.* Associations between alcohol consumption and selected cytokines in a Swiss population-based sample (CoLaus study). **Atherosclerosis**, v. 222, p. 245–250, 2012.

MATTA S. G.; BALFOUR D. J.; BENOWITZ N. L.; BOYD, T. R. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. **Psychopharmacology**, v. 190, p. 269–319, 2007.

MAUREL D.B.; BOISSEAU N.; BENHAMOU C.L.; JAFFRE C. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. **Osteoporos Int**, v. 23, p. 1–16, 2012.

MELLO N. K. Animal models for the study of alcohol addiction. **Psychoneuroendocrinology**, v. 1, p. 347-377, 1976.

NAIR P.N. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.15, p. 348-381, 2004.

NOCITI JR F.H.; NOGUEIRA-FILHO G.R.; PRIMO M.T.; *et al.* The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A histometric study in rats. **J Periodontol.**, v. 71, n. 9, p. 1460-1464, 2000.

NOCITI JR. F.H.; CESAR N.J.; CARVALHO M.D.; SAL-LUM E.A. Bone density around titanium implants may be influenced by intermittent cigarette smoke inhalation: a histometric study in rats. **Int J Oral Maxillofac Implants**, v. 17, p. 347–52, 2002.

NOGUEIRA-FILHO G.R.; FRÓES NETO E.B.; CASATI M.Z.; REIS S.R.; *et al.* Nicotine effects on alveolar bone changes induced by occlusal trauma: a histometric study in rats. **J Periodontol**, v. 75, n. 3, p. 348-52, 2004.

NYQUIST F.; LJUNGHALL S.; BERGLUND M.; OBRANT K. Biochemical markers of bone metabolism after short and long time ethanol withdrawal in alcoholics. **Bone**, v. 19, p. 51–54, 1996.

NYQUIST F.; HALVORSEN V.; MADSEN J.E.; *et al.* Ethanol and its effects on fracture healing and bone mass in male rats. **Acta Orthop Scand**, v. 70, p. 212–216, 1999.

PALMER R.M.; SCOTT D.A.; MEEKIN T.N.; POSTON R.N.; *et al.* Potential mechanisms of susceptibility to periodontitis in tobacco smokers. **J Periodontal Res.**, v. 34, n. 7, p. 363-9, 1999.

PASSERI L.A.; ELLIS R.D.E.; SINN D.P. Relationship of substance abuse to complications with mandibular fractures. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 51, p. 22–25, 1993.

PEREIRA VASCONCELOS D.F.; DIAS DA SILVA M.A.; ROCHA MARQUES M.; *et al.* Effects of simultaneous nicotine and alcohol use in periodontitis progression in rats: A histomorphometric study. **J Clin Exp Dent.**, v. 5, n. 2, p. 95-99, 2013.

PINTO, L. C. Estudo radiográfico e microscópico das lesões periapicais inflamatórias induzidas em ratos. Dissertação de mestrado. Faculdade de Odontologia de Bauru, 2006.

PLANETA, C. S. Animal models of alcohol and drug dependence. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 35, n. 2, 2013.

RAD M.; KAKOIE S.; BROHENI F.N.; POURDAMGHAN N. Effect of Long-term Smoking on Whole-mouth Salivary Flow Rate and Oral Health. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects**, v. 4, n. 4, p. 110–114, 2010.

RICHTER, W.F.; BHANSALI, SG.; MORRIS M.E. Mechanistic determinants of biotherapeutics absorption following SC administration. **AAPS J**, v. 14, p. 559–570, 2012.

RIZZOLI R; BONJOUR JP. Malnutrition and osteoporosis. **Z Gerontol Geriatr.**, v. 32, n. 1, p. 131-7, 1999.

RÔÇAS I.N.; SIQUEIRA JR. J.F.; SANTOS K.R.N. Association of *Enterococcus faecalis* With Different Forms of Periradicular Diseases. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 5, p. 315-320, 2004.

ROPER P.M.; ABBASNIA P.; VUCHKOVSKA A.; *et al.* Alcohol-related deficient fracture healing is associated with activation of FoxO transcription factors in mice. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 34, n. 12, p. 2106-2115, 2016.

SAMPSON H.W.; SPEARS H. Osteopenia due to chronic alcohol consumption by young actively growing rats is not completely reversible. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 23, p. 324–327, 1999.

SAMPSON H.W. Effects of alcohol consumption on adult and aged bone: a histomorphometric study of the rat animal model. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 22, p. 2029–2034, 2002.

SASAKI H.; HIRAI K.; MARTINS C.M.; *et al.* Interrelationship between Periapical Lesion and Systemic Metabolic Disorders. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 15, p. 2204-2215, 2016.

SCHAMBACH S.J.; BAG S.; SCHILLING L.; *et al.* Application of micro-CT in small animal imaging. **Methods.**, v. 50, n. 1, p. 2-13, 2010.

SEGURA-EGEA J.J.; JIMÉNEZ-PINZÓN A.; RÍOS-SANTOS JV.; *et al.* High prevalence of apical periodontitis amongst smokers in a sample of Spanish adults. **Intern End Journal**, v. 41, p. 310–316, 2008.

SEGURA-EGEA J.J.; MARTIN-GONZALEZ J.; CASTELLANOS-COSANO L. Endodontic medicine: connections between apical periodontitis and systemic diseases. **International Endodontic Journal**, v. 48, p. 933–951, 2015.

SILVA T.A.; GARLET G.P.; FUKADA S.Y.; *et al.* Chemokines in Oral Inflammatory Diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Disease. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 4, p. 306–319, 2007.

SIMONET W.S.; LUCEY D.L.; DUNSTAN C.R.; *et al.* Osteoprotegrin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell.*, v. 89, p. 309–19, 1997

SOARES E.V.; FÁVARO W.J.; CAGNON V.H.A.; *et al.* Effects of alcohol and nicotine on the mechanical resistance of bone and bone neoformation around hydroxyapatite implants. **Bone Miner Metab**, v. 28, p. 101–107, 2010.

SOUZA D.M.; RICARDO L.H.; PRADO M.A.; *et al.* The effect of alcohol consumption on periodontal bone support in experimental periodontitis in rats. **J Appl Oral Sci**, v. 14, p. 443-447, 2006.

SOUZA D.M.; RICARDO L.H.; KANTORSKI K.Z.; ROCHA R.F. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. **Braz Oral Res**, v. 23, p. 326-332, 2009.

SOUZA DM; SILVA A.A.; PEREIRA K.A.; *et al.* Alveolar bone loss induced by alcohol consumption in rats. **Braz Dent Sci**, v. 20, n. 4, p. 42-48, 2017.

SPANAGEL R. Recent animal models of alcoholism. **Alcohol Res Health.**, v 24, n 2, p.124-31, 2000.

SUH K.T.; KIM S.W.; ROH H.L.; *et al.* Decreased osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in alcohol-induced osteonecrosis. **Clin Orthop Relat Res**, v. 431, p. 220-225, 2005.

SUN Z.; WANG L.; PENG B. Kinetics of glycogen synthase kinase (GSK)3 β and phosphorylated GSK3 β (Ser 9) expression in experimentally induced periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 47, p. 1107–16, 2014.

SZABO G. Consequences of alcohol consumption on host defence. **Alcohol Alcohol**, v. 34, p. 830-841, 1999.

TALHOUT R.; OPPERHUIZEN A.; VAN AMSTERDAM J.G.; Sugars as tobacco ingredient: effects on mainstream smoke composition. **Food Chem Toxicol**, v. 44, n. 11, p.1789–98, 2006.

TEZAL M.; GROSSI S.G.; HO A.W.; GENCO R.J. The effect of alcohol consumption on periodontal disease. **J Periodontol**, v. 72, p.183-189, 2001.

TEZAL M.; SARA G.; GROSSI S. G.; *et al.* Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, n. 7, p. 484-488, 2004.

TOMAR S.L.; ASMA S. Smoking-attributable periodontitis in the United States: findings from NHANES III. National Health and Nutrition Examination Survey. **J Periodontol**, v. 71, n. 5, p.743–51, 2000.

TRINDADE A.C.; DE FIGUEIREDO J.A.P.; DE OLIVEIRA S.D.; *et al.* Histopathological, Microbiological, and Radiographic Analysis of Antimicrobial Photodynamic Therapy for the Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Study in Rats' Molars. **Photomed Laser Surg.**, v. 35, n. 7, p. 364-371, 2017.

TUCKER K.L.; JUGDAOHSINGH R.; POWELL J.J.; *et al.* Effects of beer, wine, and liquor intakes on bone mineral density in older men and women. **Am J Clin Nutr**, v. 89. p. 1188–1196, 2009.

TURNER, P. V.; BRABB, T.; PEKOW, C.; VASBINDER, M. A. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS**, v. 50, n. 5, p. 600–613, 2011.

VON STECHOW D.; BALTO K.; STASHENKO P.; MEÜLLER R. Three-dimensional quantitation of periradicular bone destruction by micro-computed tomography. **Journal of Endodontics**, v. 29, p. 252–6, 2003

WAGNER M.C.; ROCHA J.M.; GAIO E.J.; *et al* Effect of 15% Alcohol Dependence on Alveolar Bone Loss and TNF- α Secretion in Wistar Rats. **Braz Dent J.**, v. 27, n. 2, p.135-40, 2016.

WANG X.J.; LIU Y.F.; WANG Q.Y. Functional expression of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in human periodontal ligament fibroblasts and rat periodontal tissues. **Cell Tissue Res**, v. 340, n. 2, p. 347–355, 2010.

WARNAKULASURIYA S.; DIETRICH T.; BORNSTEIN M.M. Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. **Int Dent J**, v. 60, p.7–30, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WORLD HEALTH ORGANIZATION report on the global tobacco epidemic. *Geneva: World Health Organization*, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on alcohol and health, 2014. *Geneva: World Health Organization*, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WORLD HEALTH ORGANIZATION report on the global tobacco epidemic, 2017. Monitoring health for the SDGs. *Geneva: World Health Organization*, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. *Geneva: World Health Organization*, 2017.

XU, R.; GUO, D.; ZHOU, X.; *et al*. Disturbed bone remodelling activity varies in different stages of experimental, gradually progressive apical periodontitis in rats. **Int J Oral Sci** v. 11, p. 27, 2019.

YANG S.; ZHU L.; XIAO L.; *et al*. Imbalance of interleukin- 17+ T-cell and Foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. **Journal of Endodontics**, v. 40, p. 56–62, 2014.

YONEDA, N.; NOIRI, Y.; MATSUI, S.; *et al*. Development of a root canal treatment model in the rat. **Sci Rep** v. 7, p. 3315, 2017.

YPSILANTIS, P.; POLITOU, M.; ANAGNOSTOPOULOS, C.; *et al*. A rat model of cigarette smoke abuse liability. **Comparative medicine**, v. 62, n. 5, p. 395–399, 2012.

ZEHNDER M.; GOLD S.I.; HASSELGREN G. Pathologic interactions in pulpal and periodontal tissues. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 8, p. 663-671, 2002.

ANEXO - Aprovação do Comitê de Ética para Pesquisa com animais



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO
DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA)

ibrag
Instituto de Biologia
Roberto Alcântara
Gomes

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do consumo de álcool e administração de nicotina no desenvolvimento de lesão periapical em ratos", registrada com o nº 049/2018, sob a responsabilidade de Emmanuel João N. L. da Silva - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 16 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, em reunião de 31/07/2018.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	31/07/2022
Espécie/inhagem/raça	Rato Wistar
Nº de animais	24
Peso/idade	180-240 g / 50 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério setorial

Rio de Janeiro, 31 de Julho de 2018.

Prof. Dr. Alex C. Manhães
Coordenador
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dra. Patrícia C. Lisboa
Vice-Coordenadora
CEUA/IBRAG/UERJ