



Faculdade de Odontologia de Piracicaba
UNICAMP

DANIEL F. P. VASCONCELOS

Trabalho apresentado à disciplina de Educação para Saúde, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP, para obtenção do título de Dentista.

TCC 071

PIRACICABA - 2002

TÍTULO DO PROJETO:

**AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA INFLUÊNCIA DA NICOTINA E
ÁLCOOL NA EVOLUÇÃO DA PERIODONTITE. ESTUDO EM RATOS.**

ORIENTADORA: SILVANA P. BARROS

ORIENTADO: DANIEL FERNANDO PEREIRA VASCONCELOS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

PIRACICABA – DEZEMBRO DE 2002

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
BIBLIOTECA**

Introdução

O objetivo deste trabalho foi de avaliar histometricamente a influência da nicotina e álcool na evolução da periodontite induzida em ratos. Foram utilizados 40 ratos machos adultos (*Rattus Norvegicus*, Albinus, Wistar, SPF), com peso médio de 300g, originários do Centro de Bioterismo/UNICAMP.

Os animais foram mantidos em gaiolas, receberam ração industrial e água "ad libitum". Após o período de uma semana, a periodontite foi induzida através do posicionamento de ligadura de fio de seda no sulco gengival, ao redor do 1º molar inferior esquerdo.

Na seqüência, os animais foram divididos em grupos que receberam tratamentos com soro fisiológico, nicotina, álcool e a associação da nicotina com álcool.

Após 30 dias de iniciado o tratamento, os animais foram sacrificados e a perda óssea inter-radicular foi quantificada para os grupos teste e controle, através de um "software" analisador de imagens e feita a análise estatística dos resultados.

Materiais e Métodos

Foram utilizados quarenta ratos Wistar, procedentes do Centro de Bioterismo da UNICAMP (Protocolo aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - Instituto de Biologia- UNICAMP -CEEA-IB-UNICAMP- Nº 193-1) e mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Os ratos foram divididos aleatoriamente em oito grupos separados como segue: A - 5 ratos receberam $2\mu\text{l/g}$ de peso, via intraperitoneal, de soro fisiológico; B - 5 ratos receberam a auto-administração de álcool etílico 25% e também receberam soro fisiológico, via intraperitoneal, $2\mu\text{l/g}$ de peso; C - 5 ratos receberam $2\mu\text{l/g}$ de peso, via intraperitoneal, de uma solução de nicotina (cc.0,13 $\mu\text{l/ml}$ de soro fisiológico); D - 5 ratos receberam $2\mu\text{l/g}$ de peso, via intraperitoneal, de solução de nicotina (cc.0,13 $\mu\text{l/ml}$ de soro fisiológico) associada a auto-administração de álcool etílico 25%; E - 5 ratos receberão $2\mu\text{l/g}$ de peso, via intraperitoneal, de solução de nicotina (cc.0,19 $\mu\text{l/ml}$ de soro fisiológico); F - 5 ratos receberam $2\mu\text{l/g}$ de peso, via intraperitoneal, de solução de nicotina (cc.0,19 $\mu\text{l/ml}$ de soro fisiológico) associada a auto-administração de álcool etílico 25%; G - 5 ratos receberam $2\mu\text{l/g}$ de peso, via intraperitoneal, de solução de nicotina (cc.0,26 $\mu\text{l/ml}$ de soro fisiológico); H - 5 ratos receberam $2\mu\text{l/g}$ de peso, via intraperitoneal, de solução de nicotina (cc.0,26 $\mu\text{l/ml}$ de soro fisiológico) associada a auto-administração de álcool etílico a 25%.

Para adaptação dos animais ao consumo de álcool estabelecemos concentrações gradativamente crescentes a partir de 5% até alcançar 25%. Inicialmente os ratos dos grupos: B, D, F, H (grupos teste) começaram com a auto-administração de álcool-etílico diluído em água na concentração de 5% pelo período de uma semana . Em seguida passamos à administração de álcool diluído a 10%, para os grupos que deveriam receber

esse tratamento e esta concentração foi mantida por 20 dias. Prosseguindo com auto-administração de álcool etílico a 15% para os grupos teste, permanecendo nesse tratamento por 10 dias. Após este período todos os animais foram submetidos a indução de doença periodontal.

A indução da periodontite foi realizada no Centro Cirúrgico do Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, com sedação prévia utilizando éter sulfúrico, após a sedação inicial os animais foram anestesiados através de injeção intramuscular na região externa da coxa com uma solução de 0,8 ml/kg de Francotar e 0,3 ml/kg de virbaxyl 2%. Posteriormente, foi colocado uma ligadura de fio de seda (gutterman) ao redor do 1º molar inferior, no nível do sulco gengival. Após tal procedimento todos os animais permaneceram por uma semana mantendo-se os tratamentos estabelecidos e, então iniciou-se a administração diária de nicotina obedecendo o tratamento específico para cada grupo.

A administração diária de nicotina, via intraperitoneal, foi feita em três concentrações diferentes: 0,13µl/ml de soro fisiológico para os grupos C e D; 0,19µl/ml para os grupos E e F; 0,26µl/ml para os grupos G e H; e a dose dada foi de 2µl/g de peso dos animais.

Os grupos A e B receberam soro fisiológico (2µl/g de peso) também via intraperitoneal. A administração obedeceu um horário fixo.

Simultaneamente ao início do tratamento com nicotina a concentração de álcool foi aumentada para 25% e mantida até o final do experimento.

Após trinta dias todos os animais foram sacrificados através do deslocamento cervical e suas mandíbulas foram removidas, fixadas em formol tamponado neutro a 10% e divididas em hemimandíbulas na região de sínfise.

O material foi descalcificado em solução de ácido tricloroacético 5%, com troca da solução 3 vezes por semana, pelo período de 6 semanas.

Seguiu-se com desidratação com álcool em soluções crescentes, diafanização e a

infiltração (paraplast) e inclusão das peças. O material foi cortado em micrótomo, em cortes semi-seriados, na espessura de 6 μm .

Os cortes foram corados por Hematoxilina e Eosina e analisados sob microscopia de luz.

A área de perda óssea na região de furca radicular do primeiro molar inferior, ou seja, a área localizada entre crista óssea e cimento radicular, foi histometricamente determinada, através de sistema analisador de imagem (Image- Pro Cybernetics, Silver Spring, MD), utilizando-se 5 cortes por amostra e então realizada a análise estatística.

Resultados

Os resultados foram analisados através do teste de Tukey - intra e intergrupos.

A análise dos grupos controle (sem a indução da periodontite) revelou que não há diferença estatisticamente significativa($P > 0,05$) entre os grupos que receberam soro fisiológico e os que receberam nicotina e/ou álcool. Contudo quando os grupos tratados são comparados com os controle houve uma diferença significativa ($P < 0,05$), mostrando que a ligadura funcionou como indutor da doença. Contudo ao comparamos os grupos (controle – sem a ligadura) que receberam soro fisiológico, nicotina, álcool e a associação da mesma com o álcool não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$), demonstrando que quando não induzimos a doença periodontal através da ligadura não há perda óssea na região de furca, independentemente dos tratamentos a que foram submetidos.

Ao comparamos o grupos A com ligadura, com o grupo B, que também recebeu soro fisiológico, mas em adição recebeu álcool notamos que não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$).

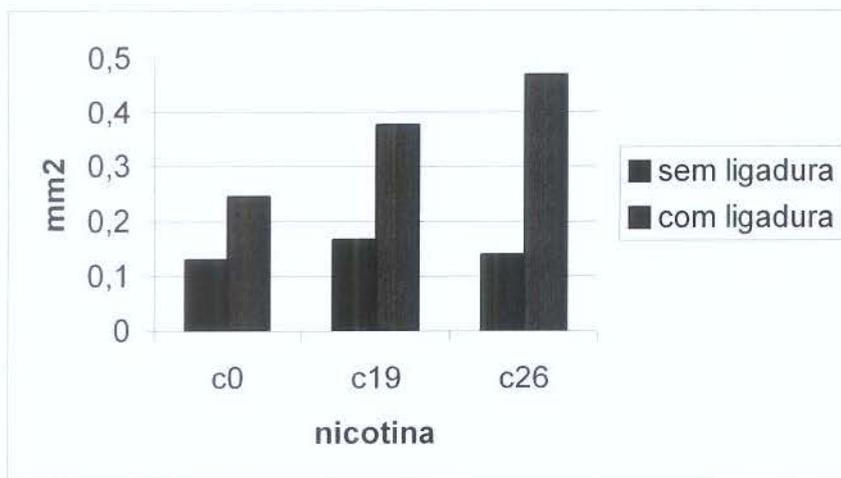
Comparando-se os grupos tratados com nicotina (independente da concentração) com os que receberam a associação da nicotina e álcool (grupos C, D, E, F, G, e H) não foi detectada diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) em área de perda óssea, contudo pudemos notar que houve perda óssea mais acentuada em todos os grupos que receberam nicotina, nas diferentes doses, quando comparados com os grupos controle.

Quando analisamos os grupos: A (tratado) que recebeu soro fisiológico, B (tratado) que recebeu soro fisiológico e álcool e grupo H (tratado), que recebeu nicotina na concentração de $0,26 \mu\text{l/ml}$ de soro fisiológico e o álcool, observamos uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) indicando maior perda óssea no grupo que teve a associação álcool e nicotina nesta mais alta concentração.

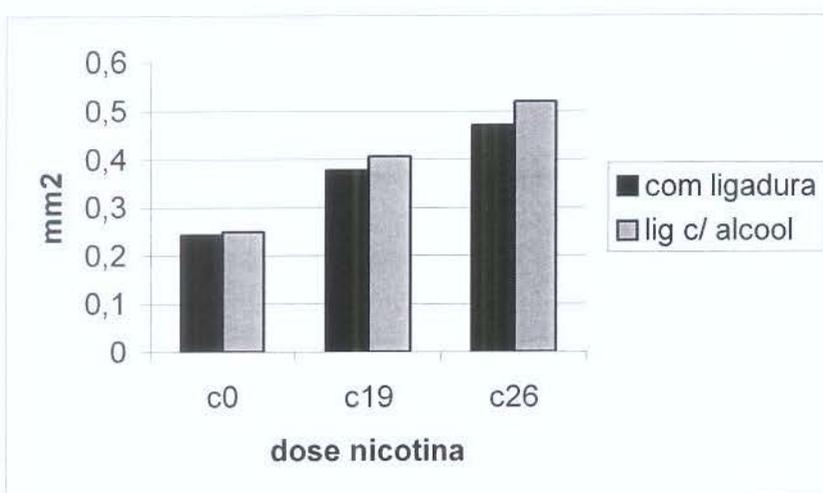
A tabela, abaixo, mostra os resultados médios por grupos e a perda óssea correspondente.

Médias das áreas dos grupos, em mm² da região de furca, do tecido conjuntivo (ligamento periodontal).

| Grupos | A | B | C | D | E | F | G | H |
|----------|------|-------------|------|-------------|------|------------|------|-------------|
| Tratado | 0.24 | 0.25 | 0.37 | 0.39 | 0.37 | 0.4 | 0.47 | 0.52 |
| Controle | 0.13 | 0.12 | 0.18 | 0.14 | 0.16 | 0.14 | 0.14 | 0.13 |



Média da área de perda óssea (mm²) da região periodontal dos dentes com ligadura e sem ligadura, que receberam diferentes doses de nicotina.



Média da área de perda óssea (mm²) da região periodontal de dentes, com ligadura, que receberam somente nicotina e dentes, com ligadura, que receberam a nicotina e álcool.

Observação: As medidas de perda óssea referentes ao grupo que recebeu nicotina na concentração de 0,13ug/ml tiveram sua análise estatística prejudicada devido a falha técnica de processamento , com conseqüente perda de duas amostras deste grupo.

As figura, abaixo, demonstram a perda óssea nos diferentes grupos:

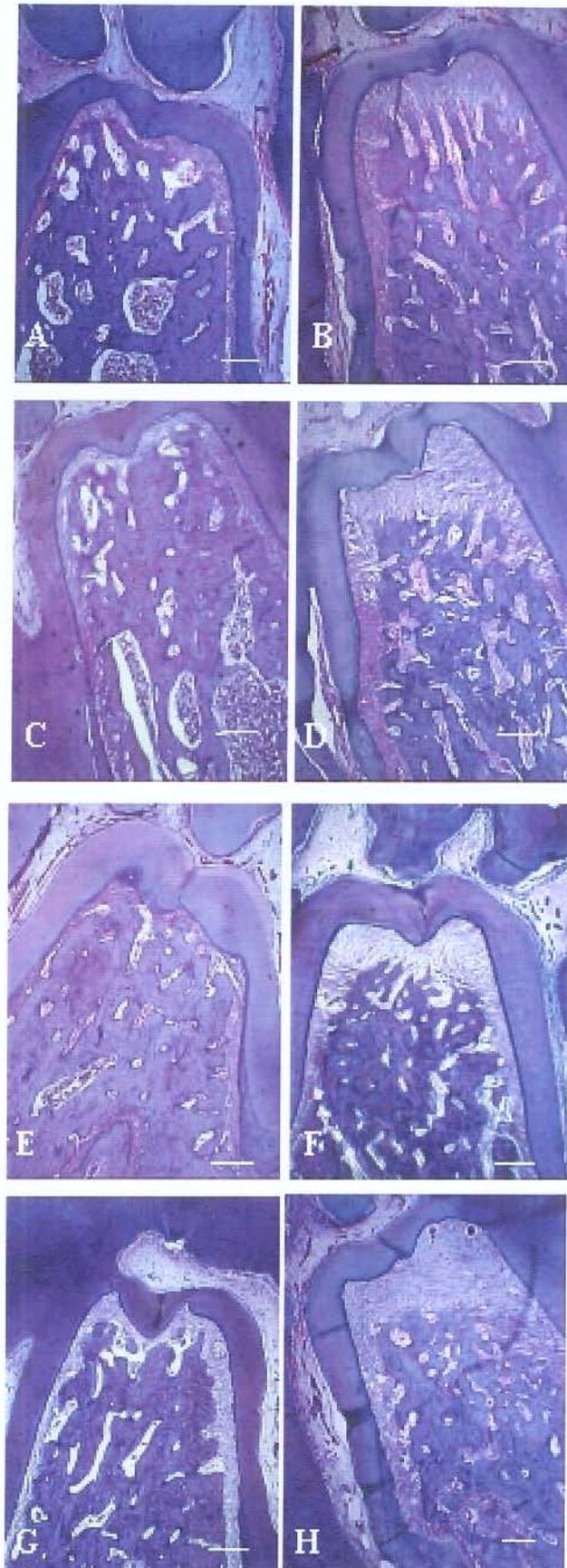


Figura 1. Fotomicrografias ilustrando as áreas de furca de: **A** - molar sem a ligadura, grupo A ; **B** - molar com a ligadura, grupo A. **C** - molar sem a ligadura, grupo C. **D** - molar com a ligadura, grupo C. **E** - molar sem a ligadura, grupo E. **F** - molar com a ligadura, grupo E. **G** - molar sem a ligadura, grupo H. **H** - molar com a ligadura, grupo H.

Discussão

Extensivos estudos que envolvem o consumo de tabaco, têm sido realizados, *in vitro* e *in vivo*, examinando principalmente os efeitos da nicotina, que corresponde a uma das principais substâncias da complexa mistura de componentes do tabaco.

Estudos *in vitro* demonstraram que a nicotina interfere na diferenciação e mineralização de células osteoblasticas, atuando também sobre os osteoclastos, portanto interferindo na modulação do metabolismo ósseo.

Estudos clínicos e experimentais evidenciam que o consumo crônico de etanol leva a um aumento da susceptibilidade à infecções. Recentes experimentos indicam que o etanol pode afetar preferencialmente células imaturas do sistema imune, resultando em interrupção do ciclo celular e/ou morte celular. A apoptose, induzida por etanol, de células imaturas do timo, parece ser o mecanismo pelo qual o etanol reduz o número de células T, contribuindo para o aumento da susceptibilidade à infecções associada ao uso crônico de etanol.

Estudos clínicos, principalmente os envolvendo carcinogênese, indicam o sinergismo do álcool e tabaco, onde o tabaco tem sido considerado como fator de risco principal, enquanto que a associação com o álcool levaria a uma potencialização da influência do tabaco, apesar de também existirem os efeitos desses fatores individualmente onde o álcool pode interferir nos mecanismos de reparo de DNA.

Nossos resultados mostraram que a atividade da nicotina não foi capaz de iniciar a doença periodontal, processo que envolve inflamação gengival por contaminação de bactérias da cavidade bucal e, com seu desenvolvimento, destruição dos tecidos periodontais - ligamento periodontal e osso alveolar - pela ação de macrófagos e linfócitos PMN.

Após a indução da doença periodontal, através do posicionamento da ligadura de fio de seda na região de sulco gengival, que funcionou como agente irritante e contaminante, pudemos observar que a nicotina agravou a perda de tecido ósseo periodontal nas diferentes concentrações utilizadas (0,13ug/ml, 0,19 ug/ml e 0,26 ug/ml de soro fisiológico) que são representativas de consumo de 10, 15 e 20 cigarros, respectivamente, contendo 1,5mg de nicotina cada.

O sinergismo do álcool e nicotina só se manifestou quando foi utilizada a dose diária, por 30 dias, de 0,26ug/ml de nicotina e consumo diário de etanol no mesmo período, nesta situação, a perda óssea periodontal, induzida por ligadura, apresentou-se com maior grau de severidade quando comparado seu efeito com mesma dose de nicotina, como único agente agravante da doença.

Dentro de nossas condições experimentais, pudemos concluir que a nicotina acentuou, de maneira dose dependente, os efeitos dos fatores locais da perda óssea periodontal previamente induzida e, que houve sinergismo entre álcool e nicotina, estatisticamente percebido somente na concentração de 0,26ug/ml, levando ao agravamento do quadro de perda óssea periodontal.

Referências Bibliográficas

- ALEXANDER, A.G. *et al.* The relationship between tobacco smoking, calculus, and gingivitis. *Dent. Health*, v.9, p.6-9, 1970.
- ARNO, A. *et al.* Alveolar bone loss as a function of tobacco consumption. *Acta Odont. Scand.*, v.17, p.3-10, 1969.
- BAKER, RC; AROOR, AR. Ethanol-induced apoptosis in human HL-60 cells. *Life Sciences* v 61, n. 23, pp. 2345-2350
- BASTIAN, R.J. WAITE, I.M. Effect of tobacco smoking on plaque development and gingivitis. *J Periodontol.*, v.49, p.480-482, 1978.
- BERGSTRÖN, J. *et al.* Cigarette smoking aids periodontal bone loss. *J. Periodontol.*, v.62, p.242-246, 1991.
- BOUCLIN, R.B. *et al.* The effects of smoking on periodontal structures: A literature review. *J. Can Dent. Assoc.*, v.63, p.356-363, 1997.
- CAMPOS, H. Estatística Experimental Não-Paramétrica. 3ª ed., Piracicaba, Editora da ESALQ-USP, 1983.
- CLARKE, N.G. & SHEPHERD, B.C. The effects of epinephrine and nicotine on gingival blood flow in the rabbit. *Arch. Oral Biol.*, v.53, p.577-582, 1981.
- DYR, W. *et al.* Involvement of nicotine acetylcholine receptors in the regulation of alcohol drinking in wistar rats. *Alcohol and Alcoholism*, v.34, n.1, Jan. 1999.
- DU, X. *et al.* Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v.29, n.2, p 80-85, 2000.
- FELDMAN, R.S. *et al.* Association between smoking different tobacco products and periodontal disease indexes. *J. Periodontol.*, v.54, p.481-486, 1983.

- GROSSI, S.G. *et al.* Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J. Periodontol.*, v.66, p.23-29, 1995.
- HANES, P.J. *et al.* Binding, uptake, and release of nicotine by human gingival fibroblasts. *J. Periodontol.*, v.62, p.147-152, 1991.
- HOGAN, H.A. *et al.* Long-term alcohol consumption in the rat affects femur cross-sectional geometry and bone tissue material properties. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, v.23, n.11, p. 1825-1833 Nov. 1999.
- JOHNSON, I.H. *et al.* Effects of local irritation and dextran sulphate administration on the periodontium of the rat. *J. Periodont.*, Copenhagen, v.10, n.6, p.332-345, Dec. 1975.
- KENNEY *et al.* The effect of cigarette smoke on human oral polymorphonuclear leukocytes. *J. Periodont. Res.*, v.12, p.227-234, 1977.
- LINDHE, E.J. MULLALY, B.H. Cigarette smoking and periodontal destruction in young adults. *J. Periodontol.*, Chicago, v.65, p.718-728, 1994.
- LÖE, H. Periodontal changes in pregnancy. *J. Periodont.*, v.36, p.209- 17, 1965.
- LÖE, H. Periodontal diseases: a brief historical perspective. *Periodonto.* 2000, Copenhagen, v.2, p.7-12, 1993.
- MICHAEL, J.P. *et al.* Inhibition of neutrophil and monocyte defensive functions by nicotine. *J. Periodontol*, Chicago, v.66, n.12, p.1047-1055, Dec. 1995.
- MONTGOMERY, D Design and Analysis of Experiments. 3rd ed., New York, John Wiley and Sons, 1991.
- NOCITI JR., F.H. *et al.* The influence of nicotine on the bone loss rate in ligature-induced periodontitis. A Histometric study in rats. *J Periodontol*, Chicago, v.71, n.9, p. 1460-1464, Sept. 2000.
- PALMER, R.M. Tobacco smoking and oral health. *Br. Dent. J.*, v.1, p.258-260, 1988.

- PREBER, H. KANT, T. Effect of tobacco smoking on periodontal tissue of 15-years-old school children *J Periodont Res.*, v.8, p.278-83, 1973.
- PINDBORG, J.J. Tobacco and gingivitis. I. Statistical examination of the significance of tobacco in the development of ulceromembranous gingivitis and in the formation of calculus. *J. Dent. Res.*, v.26, p.261-264, 1947.
- RAULIN, L.A. *et al.* The effect of nicotine on the attachment of human fibroblasts to glass and human root surfaces in vitro. *J. Periodontol.*, v.59, p.318-322, 1989.
- RIVERA-HIDALGO, F. Smoking and periodontal disease. A review of literature. *J. Periodontol.*, v.57, p.617,623, 1986.
- SAMPSON, H.W. Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: A histomorphometric study of the rat animal model. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research* ,v.22,n.9, p.2029-2034, Dec. 1998.
- SAMPSON, H.W. *et al.* Binge drinking and metabolism in a young actively growing rat model. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, v.23, n.7, p.1228-1231, Jul. 1999.
- SAMPSON, H.W. *et al.* Alcohol consumption by young actively growing rats: A study of cortical bone histomorphometry and mechanical properties. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, v.21, n.5, Aug. 1997.
- SHAY, H.B. & SMART, G.A. The association of local factors with gingivitis. *Br. Dent. J.*, v.78, p.78, p.135-139, 1945.
- SHIH, S.D. *et al.* The effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-1 on epithelial dysplasia. *J Periodontol*, v.67, n.11 p.1224-1232, Nov.1996.
- TEZAL, M. *et al.* The effect of alcohol consumption on severity of periodontal disease. *Journal of Dental Research*, p.667-670, Sept. 1996.
- TEZAL, M. *et al.* The effect of alcohol consumption on periodontal disease. *J Periodontol*, v.72, n.2, p.183-189, Feb. 2001.

UENG, S.W.N. *et al.* Effect of intermittent cigarette smoke inhalation on tibial lengthening: experimental study on rabbits. *J. of Trauma*, v.42, n.2, p.231-238, 1997.

WARR, G.; MARTIN, R. In vitro migration of human alveolar macrophages: Effects of cigarette smoking. *Infect. Immun.*, v.8, p.222-227, 1973.