

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

NÍVEL MESTRADO

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA –
PERIODONTIA

Linha de Pesquisa:

*Epidemiologia, Etiopatogenia e Repercussão das Doenças da
Cavidade Bucal e Estruturas Anexas*

Dissertação:

EFEITO DA CERVEJA SOBRE A DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA EM RATOS WISTAR

RAFAEL NASCIMENTO LOURENCI

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Gaio

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Nascimento Lourenci, Rafael
EFEITO DA CERVEJA SOBRE A DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA EM RATOS WISTAR / Rafael Nascimento
Lourenci. -- 2017.
56 f.
Orientador: Eduardo José Gaio.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto
Alegre, BR-RS, 2017.

1. Lúpulo. 2. Periodontite. 3. Álcool. 4. Perda
óssea alveolar. 5. Ratos. I. José Gaio, Eduardo,
orient. II. Titulo.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RAFAEL NASCIMENTO LOURENCI

**EFEITO DA CERVEJA SOBRE A DOENÇA PERIODONTAL
INDUZIDA EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia, nível Mestrado, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito final para obtenção do título em Mestre em Clínica Odontológica – Periodontia.

Linha de Pesquisa: Epidemiologia, Etiopatogenia e Repercussão das Doenças da Cavidade Bucal e Estruturas Anexas

Orientador: Prof. Dr. Eduardo José Gaio – UFRGS

PORTO ALEGRE, 2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Dari e Elizabeth, pelo apoio incondicional durante a realização do presente trabalho, assim como aos meus irmãos (Thiago e Clarissa).

Sem os ensinamentos do professor Eduardo José Gaio, nada disso teria sido possível. Gostaria que soubesse que minha gratidão, por sua disponibilidade e paciência, será eterna.

Assim como ao professor Vinícius Coelho Carrard, o qual teve papel fundamental, pois possibilitou nosso acesso ao Hospital de Clínicas para a realização do estudo. Obrigado pela confiança.

Gostaria também de agradecer ao colega Tobias Spuldaro, o qual foi responsável pelo *start* do presente trabalho experimental, e ao queridíssimo amigo e colega Harry Oballe; ambos me ajudaram muito a concluir com êxito a realização do trabalho experimental; obrigado amigos.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo fomento da FIPE a este estudo, assim como a todos os funcionários da Unidade de experimentação animal.

E, por fim, ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

RESUMO

Evidências científicas têm apontado para inúmeros benefícios do consumo baixo/moderado de cerveja sobre a saúde dos indivíduos. Uma recente meta-análise com mais de 290.000 pessoas confirma a redução no risco de doenças cardiovasculares tanto para o vinho, como também para a cerveja, desde que consumido em doses baixas ou moderadas. A essas substâncias têm se atribuído efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, bem como ações na função vascular. Uma vez que as doenças periodontais apresentam uma natureza infecto-inflamatória, é lícito supor que o consumo de cerveja possa trazer benefícios para os tecidos periodontais. Para isso, o presente estudo abordou de forma prospectiva a ação da cerveja rica ou não em lúpulo sobre a perda óssea alveolar (POA) em modelo animal. Para isso, 64 ratos Wistar machos com 60 dias foram utilizados, divididos em 8 grupos experimentais. Após a eutanásia, o padrão de destruição óssea foi avaliada morfometricamente nos diferentes grupos experimentais. Para os grupos submetidos a indução de POA por meio de ligadura, menores médias de destruição periodontal foram encontradas nos grupos expostos a cerveja, especialmente no que se refere a face palatina ($p < 0.01$) e a média de POA no dente ($p < 0.01$). Já na comparação entre os grupos que não sofreram indução de POA, a média de destruição periodontal foi estatisticamente menor somente na face palatina do grupo que recebeu cerveja com alto teor de lúpulo ($p = 0.01$), quando comparada ao controle. Além disso, os ratos expostos a cerveja com alto teor de lúpulo apresentaram uma menor ocorrência de periodontite quando comparado aos demais grupos experimentais. Concluiu-se que o consumo de cerveja enriquecida com lúpulo parece trazer um efeito protetor sobre a POA induzida ou não por meio de ligadura em modelo animal. Além disso, a presença de lúpulo na cerveja pode ser benéfica na diminuição da ocorrência de periodontite experimental.

Palavras-chave: Lúpulo, perda óssea alveolar, ratos, periodontite, álcool.

ABSTRACT

Effects of a low/moderate consumption of beer on human health has been reported. A recent meta-analysis confirms an important reduction in cardiovascular risk as much for wine as for a beer. Vascular improvement and antioxidant/anti-inflammatory effects should be related with this point. Periodontal diseases have an infectious-inflammatory nature. Therefore, beer consumption can benefit the periodontal health. For that, the aim of the present study was to assess the effect of beer enriched with hops on alveolar bone loss (ABL) in an animal model. Sixty-four, 60-days-old, male Wistar rats in 8 experimental groups were stratified. After euthanasia, the ABL in the different experimental groups was evaluated. The groups that were not ligature-induced presented less ABL in the beer group, especially regarding the palatal face ($p < 0.01$) and mean of ABL in the tooth ($p < 0.01$). In the comparison between groups that did not undergo ABL induction by ligature, mean periodontal destruction was statistically lower in the group that received beer with high hops concentration ($p = 0.01$) when compared to the control group. In addition, the rats that were exposed to beer with high hops concentration experienced less occurrence of periodontitis than other groups. It can be concluded that the consumption of beer enriched with hops seems to protect against ABL induced or not by ligature. In addition, lower occurrence of experimental periodontitis was experienced in the enriched hops beer group.

Key words: Hops, alveolar bone loss, rats, periodontitis, alcohol

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	8
2.REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1.História da cerveja	10
2.2.Efeitos sobre a saúde	10
2.3.Bioquímica da cerveja - lúpulo	13
2.4.Doenças Periodontais	14
3.JUSTIFICATIVA DA PESQUISA	16
4.OBJETIVOS	18
4.1.Geral	18
4.2.Específicos	18
5.METODOLOGIA	19
5.1.Delineamento da Pesquisa	19
5.2.Considerações éticas	19
5.3.Local de Origem e Local de Realização da Pesquisa	19
5.4.Grupos experimentais e cálculo amostral	20
6.PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	22
6.1.Indução da Doença Periodontal	22
6.2.Administração das Soluções Alcoólicas	23
6.3.Consumo de Alimento e Peso Corporal dos Animais	23
6.4.Avaliação Clínica dos Animais	24
6.5.Eutanásia e Descarte das Carcaças dos Animais	24
6.6.Obtenção das Peças Maxilares e Análise Morfométrica da Perda	24
6.7.Futuras Análises	25
7.CONTROLE DE QUALIDADE DO ESTUDO	26
8.ANÁLISE DOS DADOS	27
8.1.Hipótese estatística	27
8.2.Análise estatística	27
9. RESULTADOS	28
10.DISCUSSÃO	32
11.CONCLUSÕES	36
12.REFERÊNCIAS	38

1.INTRODUÇÃO

O interesse científico em investigar os possíveis efeitos benéficos para a saúde do consumo de álcool começou no final da década de 1950 com o “*Seven Countries Study*” (Feinleib, 1981). Em 1979, St Leger *et al.* publicaram uma análise na *Lancet*, mostrando que países com alto consumo de vinho apresentavam taxas de mortalidade bastante baixas por doenças cardiovasculares. O estudo baseou-se em dados agregados em um modelo de análise transversal, não em indivíduos seguidos ao longo da vida. Com isso, os métodos e as conclusões utilizados receberam inúmeras críticas. Em 1981, Marmot *et al.* relataram pela primeira vez uma relação em forma de U entre o consumo de álcool e qualquer causa de mortalidade em funcionários públicos de Whitehall, Londres. Desde então, numerosos estudos epidemiológicos corroboram a relação inversa entre consumo de álcool e risco cardiovascular, morbidade e mortalidade. Muito embora resultados dispares possam ser observados na literatura, diferentes meta-análises têm apontado para um efeito benéfico do consumo leve/moderado de álcool sobre a saúde dos indivíduos.

Diferentes mecanismos foram propostos para explicar esse efeito protetor do álcool em doenças cardiovasculares, morbidade e mortalidade. Por exemplo, o aumento dos níveis de colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL), diminuição dos níveis de colesterol de baixa densidade (LDL), redução da agregação plaquetária, além de efeitos benéficos sobre a inflamação já foram relatados (Rimm *et al.*, 1999; Di Castelnuovo *et al.*, 2009). Por outro lado, efeitos anti-aterogênicos e anti-trombóticos e a regulação da função endotelial foram atribuídos principalmente aos constituintes do vinho (Gresele *et al.*, 2011) e da cerveja (Piazzon *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2011), respectivamente. Além disso, há substanciais evidências para sugerir que bebidas alcoólicas ricas em polifenóis, como vinho e cerveja, impedem a supressão do sistema imunológico, desencadeando um efeito protetor sobre a imunidade. Em outras palavras, adultos saudáveis que consomem regularmente uma quantidade baixa ou moderada de cerveja/vinho podem ser

menos propensos a infecções e inflamações. Esses fatos podem explicar os efeitos protetores do consumo moderado sobre a saúde (Romeo et al., 2007).

Uma vez que a periodontite tem na sua etiopatogênese características de uma doença infecto-inflamatória, é lícito supor então que o consumo de álcool possa afetar os tecidos periodontais de alguma forma. Diversos estudos já foram reportados na literatura e os resultados apresentam-se conflitantes. Isso ocorre muito provavelmente devido a grande heterogeneidade entre os estudos, além da inclusão de fatores de confundimento e das diferentes definições do que é periodontite. Entretanto, estudos longitudinais como o de Wagner et al (2017) apontam para um potencial efeito benéfico do vinho sobre a progressão de perda de inserção em homens não-fumantes quando consumido em baixas doses diárias. Muito embora exista conflito de resultados na literatura sobre o assunto, muito pouco se sabe sobre o consumo de cerveja rica em lúpulo sobre as estruturas do periodonto durante o processo de doença, sendo este o assunto da presente dissertação.

2.REVISÃO DA LITERATURA

2.1.História da Cerveja

É difícil definir com precisão o início do histórico da cerveja. No entanto, evidências arqueológicas mostram que o nascimento da cerveja foi o mais tardar em 3000 a.C., pelos sumérios. Evidências também estão presentes em sua linguagem. Eles criaram a palavra "kasto", referindo-se a cerveja. Muitas outras palavras para os ingredientes, tipos de cerveja e utensílios de cerveja foram criadas. Além disso, poemas sobre o processo de fabricação de cerveja também são fortes evidências da sua criação nesse período (Walther et al., 2015).

Depois que os sumérios começaram a fabricar cerveja, as populações do Oriente Médio se tornaram fãs leais. Já na Grécia e em Roma, a cerveja não era aceita porque as pessoas preferiam o vinho. No entanto, nas terras ao norte das fontes de uva, a cerveja era popular por seu próprio charme. Após a descoberta do Novo Mundo, os imigrantes trouxeram as técnicas de fabricação de cerveja para a América, e na sequência, ela foi introduzida na Ásia com forte aceitação (Walther et al., 2015). Na história do Brasil, devido a colonização portuguesa que priorizava o consumo de vinho, a cerveja demorou a tornar-se popular. Inicialmente, a cerveja no Brasil era produzida de forma caseira e consumida somente pelas famílias de imigrantes. Foi com a abertura dos portos em 1808 que se iniciou a entrada de cervejas importadas, principalmente as inglesas (Coutinho, 2008). Atualmente, o consumo anual global de cerveja atinge cerca de 190 bilhões de litros, tornando-se a bebida alcoólica mais popular em todo o mundo.

2.2.Efeitos sobre a saúde

Os possíveis efeitos benéficos ou não do álcool sobre o organismo já vêm sendo estudados há décadas. A relação de risco atribuído entre o

consumo de álcool e os eventos cardiovasculares ou mortalidade em pessoas aparentemente saudáveis é descrita como uma curva em forma de “J” ou “U”, atribuída a uma combinação relacionada à dose de efeitos benéficos e nocivos ao seu consumo. Isso significa dizer que indivíduos com algum consumo de álcool encontram-se protegidos de doenças cardiovasculares/morte, quando comparados aqueles que não estão expostos ao álcool ou aqueles que consomem altas doses. Além da quantidade, o tipo de bebida alcoólica consumida também tem sido alvo de diferentes estudos.

É sabido que a cerveja tem na sua composição propriedades antioxidantes, que são de grande interesse para a manutenção do equilíbrio oxidante/antioxidante necessário para um estilo de vida saudável. Fisiologicamente o corpo humano responde ao estresse oxidativo ativando suas defesas antioxidantes endógenas. Entretanto, essa resposta natural pode ser insuficiente por si só e, portanto, a ingestão de compostos antioxidantes bioativos exógenos podem desempenhar um importante papel no fortalecimento das defesas do organismo. Como tal, o consumo de alimentos contendo antioxidantes naturais podem contribuir para a manutenção do equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes. Ou até mesmo, para inclinar essa balança em favor dos antioxidantes pode ser de vital importância na homeostase. Sendo assim, o consumo de frutas, legumes, azeite e certas bebidas, como cerveja, café e chá têm sido inversamente associados a diferentes situações fisiopatológicas ligadas ao dano oxidativo (Codoñer-Franch et al., 2013).

A cerveja é uma bebida com alta capacidade antioxidante, devido ao seu conteúdo de compostos polifenólicos, vitaminas e melanoidinas, entre outros componentes. Essa capacidade antioxidante tem sido amplamente estudada nas últimas décadas e sugerem um importante papel da cerveja na prevenção de várias doenças (Joshi et al., 1999; Gerhäuser et al., 2003; Patil et al., 2009; Sohrabvandi et al., 2012). Diferentes delineamentos de estudo têm mostrado isso de forma muito consistente.

A capacidade antioxidante da cerveja tem sido estudada *in vitro* por vários autores usando diferentes métodos (Vinson et al., 2003; Rivero et al.,

2005; Tedesco et al., 2005). Esses estudos obtiveram valores diferentes para a capacidade antioxidante da cerveja, que tendem a ser maiores para cervejas mais escuras do que para suas contrapartes mais leves e sem álcool (Rivero et al., 2005). Esses achados podem ser atribuídos especialmente aos diferentes teores de polifenóis encontrados nas cervejas. Esses modelos de estudos mostram uma correlação positiva entre o teor de polifenóis da cerveja e sua capacidade antioxidante (Tedesco et al., 2005). Rivero e colaboradores (2005) também estudaram in vitro do efeito da cerveja sobre biomarcadores de estresse oxidativo. Eles mostram que a cerveja exerce um efeito protetor contra danos no DNA (Rivero et al., 2005).

Outros mecanismos também podem estar ativados e podem explicar esse efeito protetor da cerveja sobre a saúde dos indivíduos: aumento dos níveis de HDL (Hendriks et al, 1998; Sierksma et al., 2002), aumento da atividade da paraoxonase (Van der Gaag et al., 1999), melhor efluxo do colesterol (Van der Gaag et al., 2001), estímulo da fibrinólise (Hendriks et al., 1994) e a diminuição da formação de coágulos (Dimmitt et al., 1998) estão descritos na literatura. Um recente consenso publicado em 2016 (Gaetano et al., 2016) por experts na área, concluiu que o consumo moderado/leve de cerveja pode sim trazer benefícios adicionais a saúde do indivíduo, especialmente as condições cardiovasculares. Entretanto, os autores são enfáticos sobre os danos causados pelo consumo excessivo desse produto, que pode causar diversos efeitos deletérios tanto para a saúde dos indivíduos quanto para a sociedade. Efeitos como degeneração do sistema nervoso central e periférico, hepatite, cirrose, além do aumento da incidência de cânceres, cardiomiopatia e miopatia estão bem documentados na literatura (Cooper, 1994). Além disso, o consumo excessivo de álcool é descrito por acarretar problemas na pele e no epitélio do trato digestório (Reidy; McHugh; Chen et al, 2014). Ainda, a cerveja possui grandes quantidades de proteínas, além de conter peptídeos derivados das prolaminas, conhecidas por desencadear alergias em celíacos (Colgrave et al, 2013).

2.3. Bioquímica da cerveja – Lúpulo

Além da água que é o principal constituinte em quantidade, a cerveja é também composta pela cevada, lúpulo e fermento. Em relação ao lúpulo, este é uma espécie de videira perene, que pertence ao gênero *Humulus* da família Urticaceae. Os antigos consideravam-no como um material medicinal. A planta é dióica e as flores têm valor de fermentação. As flores são verdes ou amarelo-verde, em forma de pinha, de 3 a 6 cm de comprimento, com 30 a 50 pedaços de flores cobertos por uma coluna vertebral. A base do cone de lúpulo tem muitas partículas amarelas, comumente conhecidas como "pólen", mas na verdade são resina e óleo de lúpulo secretado pelas glândulas de lúpulo. É a eficácia única dessas secreções que faz do lúpulo uma matériaprima indispensável no processo de fermentação (Nogueira, 2005).

A resina de lúpulo e o óleo de lúpulo, que são solúveis em água, são substâncias com grande valor de fermentação. O lúpulo contém 20-25% de ingredientes solúveis em água, incluindo açúcares, aminoácidos, proteínas, polifenóis e sais inorgânicos, que podem ser dissolvidos diretamente no mosto fervente. Sabe-se que há cerca de 2% de açúcar contido no lúpulo, que é principalmente frutose e glicose (Malowicki & Shellhammer, 2005).

Os polifenóis no lúpulo são responsáveis por 4 a 8% dos componentes do lúpulo, dependendo principalmente das espécies de lúpulo e do histórico de crescimento. Eles podem ser divididos em quatro categorias: ácidos fenólicos, flavonóides, catequinas e antocianidinas. As propriedades dependem muito do grau de polimerização. Os polifenóis de baixo peso molecular são antioxidantes naturais e representam, em grande medida, o poder redutor do mosto, protegendo assim a cerveja contra a oxidação e melhorando a estabilidade do sabor. Polifenóis de peso molecular maior contribuem para a formação de cor e o aspecto turvo da cerveja. Além disso, no entanto, os polifenóis podem causar uma adstringência desagradável ao sabor (Nogueira, 2005).

O lúpulo é a principal fonte de muitos produtos naturais e a flavona é uma das mais importantes. A flavona é um polifenol vegetal com atividade antioxidante e quelante. Como consequência, suas características farmacológicas e biológicas são notáveis. Além do lúpulo, frutas, legumes, chá e cacau em pó também são importantes fontes de produção de flavonas. Atualmente, existem 4000 tipos de flavonas que foram descobertas e identificadas. No entanto, o lúpulo é a única fonte que contém flavonóides naturais de prenilo. Na dieta humana, beber cerveja é a principal maneira de absorver as flavonas (Malowicki & Shellhammer, 2005).

2.4. Doenças Periodontais

Existem diferentes tipos de doenças periodontais que podem afetar a população. No entanto, as de maior ocorrência são a gengivite (somente inflamação) e a periodontite (inflamação e destruição dos tecidos periodontais). Estas se caracterizam por serem doenças com uma natureza infecto-inflamatória que acometem os tecidos de sustentação e proteção do dente (Socransky, et al, 1998). Muito embora a infecção bacteriana seja essencial para o início da doença, elas são insuficientes para explicar todo o processo etiopatogênico. Fatores ligados ao hospedeiro, como o meio ambiente, doenças sistêmicas, hábitos comportamentais assumem fundamental importância na explicação do início, desenvolvimento e severidade da doença (Page, et al, 2000). Apesar de existirem centenas de diferentes tipos de bactérias na cavidade bucal que se aderem sobre a superfície não descamativa do dente, algumas poucas estão associadas a cadeia causal. No caso das periodontites, a presença aumentada de bactérias anaeróbias gram-negativas na área subgengival como a *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Treponema denticola* e *A. actinomycetemcomitans* estão associadas a destruição gengival (Socransky, et al 1998).

Por outro lado, a presença ou não, bem como a severidade dessa destruição, é melhor explicada pelo desequilíbrio existente entre os mecanismos de resposta imune-inflamatórios do hospedeiro frente ao

acúmulo dessas bactérias. Entre os principais componentes dessa quebra de homeostase estão o desequilíbrio na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (Birkedal-Hansen, 1993), a produção de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio (Bartold, Van Dyke, 2013) e alterações nas funções de células de defesa, como o neutrófilo e o macrófago (Guentsch, et al, 2009). Muito embora ainda não sejam completamente compreendidos, esses são os mecanismos, que melhor elucidam a etiopatogênese das doenças periodontais. Esses processos acima citados já foram extensamente estudados e associados aos principais fatores de risco para o desenvolvimento e severidade das doenças gengivais, tais como a exposição ao fumo (Carvajal, et al, 2016; Johnson, Hill, 2004) e a presença do diabetes mellitus descontrolado (Campus et al, 2005). Por outro lado, pouco se sabe sobre possíveis fatores de proteção a essas doenças. Medicamentos anti-inflamatórios e antibióticos já foram estudados previamente e mostram resultados clínicos insatisfatórios para seu uso indiscriminado, tendo sua aplicação restrita a poucos casos (Van Dyke, 2008; Lai et al, 2011).

O consumo de álcool em baixas doses/concentrações tem apresentado resultados interessantes no que se refere a preservação dos tecidos gengivais. Recentemente, Wagner e colaboradores (2017) realizaram um levantamento epidemiológico longitudinal e abordaram o assunto. Nesse artigo, os autores encontram que indivíduos homens não-fumantes que consumiam baixas doses de álcool apresentavam menor progressão de perda de inserção periodontal do que aqueles que bebiam doses elevadas de álcool. Por outro lado, uma recente meta-análise encontra resultados diferentes do efeito do álcool sobre o periodonto (Wang et al., 2016). Entretanto, cabe ressaltar que não há estratificação para tipo de bebida alcoólica, além do que a maior parte dos estudos incluídos não apresenta dados sobre controle do biofilme. No entanto, quando a análise é estratificada para quantidade consumida, os autores encontram um pequeno efeito protetor do álcool (menos de 30g/dia) sobre a periodontite. Além disso, pouco se sabe sobre a plausibilidade biológica desses achados, pois os mesmos são gerados na maior parte das vezes por estudos com natureza epidemiológica observacional (Tezal et al., 2001; Pitiphat et al., 2003; Tezal et al., 2004).

Além disso, não há dados sobre o consumo de cerveja sobre o periodonto em estudos populacionais.

Até o presente momento, a cerveja enriquecida com lúpulo foi testada apenas em modelos celulares *in vitro*. De acordo com Inaba et al. (2005), a estimulação de células do ligamento periodontal (células conjuntivas) com lúpulo foi capaz de proteger essas células da ação da *Porphyromonas gingivalis*. Da mesma forma, Kou e colaboradores (2008) estimularam células epiteliais com *P. gingivalis* e avaliaram a ação do lúpulo sobre a expressão de ciclooxigenase (COX)-2, IL-6 e 8 e metaloproteinase da matrix (MMP)-1 e 3 por meio de PCR em tempo real. Os autores evidenciaram que o lúpulo se apresentou como um potente inibidor de resposta inflamatória celular. Muito embora existam resultados motivadores no que se refere ao uso em modelos *in vivo*, nenhum estudo foi publicado mostrando os possíveis benefícios da cerveja enriquecida ou não com lúpulo sobre os tecidos periodontais.

3.JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

Por se tratar de uma bebida amplamente consumida na população, pesquisas envolvendo o consumo de cerveja são relevantes para o conhecimento científico. Além disso, pouco se conhece sobre os possíveis efeitos benéficos do consumo consciente da cerveja sobre o organismo. Até o presente momento, não é encontrado na literatura nenhum artigo correlacionando os efeitos da cerveja sobre o que diz respeito ao aparecimento, desenvolvimento e gravidade das doenças periodontais destrutivas (doença com danos permanentes e com alta prevalência nas populações). Nos dias de hoje, essa doença é a principal causa de perda de dentes e um importante preditor de risco para perda futura de implantes (Konstantinidis et al., 2015). Wright e colaboradores (2008) demonstraram que a cerveja é no mínimo equivalente ao vinho sob a ótica nutricional no combate as doenças cardiovasculares. A justificativa mais plausível diz respeito a grande quantidade de polifenóis encontrados na cerveja, o que contribui para

o equilíbrio e melhora dos processos imune-inflamatórios do organismo por diferentes mecanismos biológicos (Pietta, 2000). Uma vez sabido que as cervejas possuem grande quantidade desses compostos (Gerhauser, 2005) e tendo a doença periodontal um caráter infecto-inflamatório, é lícito supor que possa haver benefícios da cerveja ou de seus componentes sobre o aparecimento e desenvolvimento das doenças periodontais.

4.OBJETIVOS

4.1.Geral

Avaliar em ratos Wistar o efeito do consumo de cerveja rica ou não em lúpulo sobre a perda óssea alveolar induzida por ligadura. A hipótese experimental é que devido o alto teor de lúpulo presente na cerveja IPA, está poderá representar um importante fator de proteção ao desenvolvimento da periodontite induzida em modelo animal.

4.2.Específicos

a) Comparar morfometricamente a perda óssea alveolar induzida por ligadura e espontaneamente em ratos machos Wistar quando expostos a cerveja rica ou não em lúpulo, solução alcoólica e controle;

b) Determinar a ocorrência de doença periodontal entre os diferentes grupos experimentais.

5.METODOLOGIA

5.1.Delineamento da Pesquisa

Este estudo foi realizado em modelo animal, sendo prospectivo, randomizado, controlado e cego.

5.2.Considerações éticas

Os procedimentos propostos para pesquisa científica em animais do presente projeto obedeceram a normas propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) através da Lei Federal 11.794/2008, Resolução Normativa nº30 (fevereiro de 2016) e Diretriz Brasileira para o Cuidado e a utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA). Para a eutanásia dos animais o presente estudo seguiu as normas propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) através da Lei Federal 11.794/2008, Resolução Normativa nº13 e Diretrizes da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. O presente projeto de pesquisa foi submetido à Comissão Científica e Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA/HCPA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e aprovado.

5.3.Local de Origem e Local de Realização da Pesquisa

Os animais foram obtidos no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Previamente ao início do estudo, os animais foram pesados, randomizados e agrupados, conforme grupo experimental. Cada animal recebeu uma marcação em seu rabo (numeração) com caneta permanente e as caixas foram identificadas de acordo com o grupo experimental.

Foram utilizados 64 ratos Wistar machos com idades de 60 dias divididos em 8 grupos (4 controles e 4 testes), por meio de randomização estratificada por peso. Foram alocados de 2 a 3 animais por caixa-moradia de plástico, mantidas na Unidade de Experimentação Animal (UEA) do Hospital de

Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Os animais foram mantidos em um ciclo fotoperiódico de 12 horas claro/escuro em temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa do ar de 40-60%. Os animais permaneceram os 14 dias iniciais em período de aclimação. Foi oferecida dieta comercial peletizada *ad libitum* padrão para a espécie e líquido de acordo com o grupo experimental. Quanto ao consumo de líquido, os animais receberam o líquido destinado ao seu grupo experimental por um período de 12 horas (noite), e água pelas demais 12 horas (dia). Foram realizados todos os procedimentos para minimizar a dor e o desconforto durante o estudo.

5.4. Grupos experimentais e cálculo amostral

Os grupos experimentais foram os seguintes:

Controles:

- Grupo 1: os animais receberam ração *ad libitum* e água;
- Grupo 2: os animais receberam ração *ad libitum* e solução alcoólica de 6,7% (mesma graduação alcoólica das cervejas oferecidas aos grupos 3 e 4);
- Grupo 3: os animais receberam comida *ad libitum* e cerveja tipo Indian Pale Ale (IPA), conforme descrito no item 'Administração de soluções alcoólicas';
- Grupo 4: os animais receberam comida *ad libitum* e cerveja tipo Pilsen, conforme descrito no item 'Administração de soluções alcoólicas';

Testes:

- Grupo 5: os animais receberam ração *ad libitum* e água e foi induzida a doença periodontal através da colocação de ligadura nos segundos molares superiores;
- Grupo 6: os animais receberam ração *ad libitum* e solução alcoólica de 6,7% (mesma graduação alcoólica das cervejas oferecidas aos grupos

3 e 4) e foi induzida a doença periodontal através da colocação de ligadura nos segundos molares superiores;

- Grupo 7: os animais receberam comida *ad libitum* e e cerveja tipo IPA, conforme descrito no item 'Administração de soluções alcoólicas'. Além disso, tiveram induzida a doença periodontal através da colocação de ligadura nos segundos molares superiores;
- Grupo 8: os animais receberam comida *ad libitum* e e cerveja tipo Pilsen conforme descrito no item 'Administração de soluções alcoólicas'. Além disso, tiveram induzida a doença periodontal através da colocação de ligadura nos segundos molares superiores;

De acordo com o Beer Judge Commission Program que classifica as cervejas (BJCP Beer Guidelines 2015 – www.bjcp.org), os animais do grupo 3, 4, 7 e 8 receberam cerveja do tipo Indian Pale Ale, com teor alcoólico de 6,7% (rica ou não em lúpulo).

Para o cálculo amostral utilizou-se como base o estudo de (Souza, Ricardo et al. 2009). Neste estudo foram observadas diferenças de aproximadamente 0,7 mm entre os grupos experimentais expostos a álcool em concentrações de 10%. Assumindo-se um alfa de 5% e um beta de 10%, chegou-se a um número total de 8 animais por grupo experimental. A Figura 1 demonstra esquematicamente o desenho experimental do estudo.

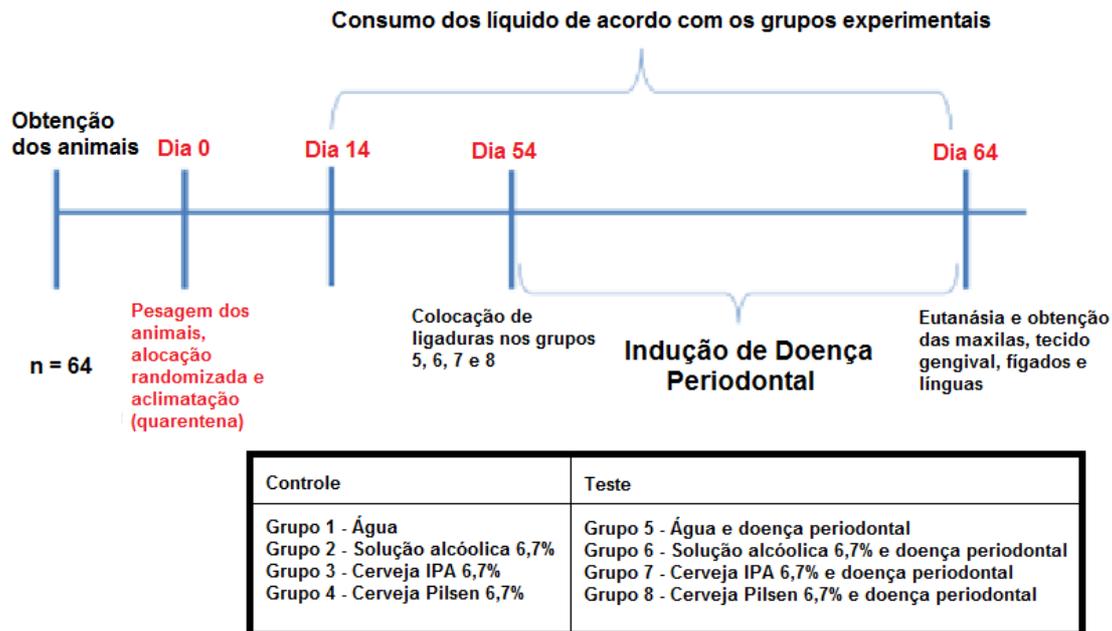


Figura 1. Desenho do estudo

6. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

6.1. Indução da Doença Periodontal

Foi induzida doença periodontal (inflamação de gengiva com consequente perda de tecido ósseo), por meio de colocação de ligadura no segundo molar superior de ambos os lados (direito e esquerdo). A colocação da ligadura foi feita mediante anestesia geral, sob supervisão de médico-veterinário. Os grupos que não receberam a ligadura também foram anestesiados nesse momento para que se tenha controle do viés de estresse. As ligaduras foram colocadas através de anestesia inalatória por isoflurano vaporizado em 100%V de oxigênio por meio de máscara facial. Para a indução anestésica utilizou-se o isoflurano 5V% e para manutenção 2-3V%. Usou-se para a analgesia trans e pós-operatório o fármaco Tramadol (10mg/Kg) administrada por via intra-peritoneal, logo após o procedimento. A ligadura consiste na colocação de fio de seda (4-0) - Ethicon® nos espaços

interdentais. Esta foi colocada com auxílio de duas pinças porta agulha do tipo Castro Viejo. O nó foi sempre realizado na face vestibular do dente. As ligaduras foram posicionadas subgengivalmente nos segundos molares superiores direitos e esquerdos para a indução de inflamação periodontal(Fernandes et al. 2007).

6.2.Administração das Soluções Alcólicas

Foram utilizadas cervejas artesanalmente produzidas a partir de receita criada para esta pesquisa baseada no estilo Indian Pale Ale e Pilsen, segundo o BJCP 2015, em virtude de suas características, quantidades de lúpulo (a primeira tem alto teor; a segunda, um teor reduzido). Desta forma, foi possível saber exatamente com qual tipo de insumos a cerveja foi feita e inferir sobre a influência das mesmas nos efeitos eventualmente observados durante os experimentos. As cervejas foram produzidas pela Cervejaria Estilingue LTDA, com matéria prima altamente selecionada, obtendo-se uma bebida de alto padrão de qualidade e artesanal. A concentração alcoólica foi de 6,7% e, para tanto, uma solução alcóolica na mesma concentração foi administrada para outro grupo, uma vez que sabe-se que o álcool em baixas concentrações pode ter efeitos benéficos sobre a perda óssea alveolar espontânea e sobre a doença periodontal induzida em ratos (Oballe et al., 2104; Wagner et a., 2016). Tanto as garrafas de álcool quanto as garrafas de cerveja rica ou não em lúpulo permaneceram nas caixas-moradias somente durante o ciclo fotoperiódico de escuro (12 horas). Após esse período, as garrafas foram trocadas por água. Durante toda a fase experimental, o consumo dessas substâncias, bem como da água nos grupos controles, foi mensurado diariamente.

6.3.Consumo de Alimento e Peso Corporal dos Animais

O consumo da ração (em gramas) foi avaliado a cada dois dias nos diferentes grupos experimentais em balança eletrônica. Da mesma forma, os

animais também foram pesados semanalmente. A variação de peso ao longo do estudo serviu também como um indicador de saúde dos animais.

6.4.Avaliação Clínica dos Animais

Os sinais de dor aguda ou crônica como o ato excessivo de lamber-se, coçar-se, vocalizar, bem como postura anormal, prostração e atividade motora reduzida (Classen, 2000) foram monitorados ao longo do experimento. Além disso, foi realizada a avaliação clínica-comportamental por parte da veterinária da UEA.

6.5.Eutanásia e Descarte das Carcaças dos Animais

Os animais foram mortos por decapitação nas 24 horas após a última avaliação in vivo e em sala distinta da qual os animais eram mantidos de acordo com a normativa número 13 do CONCEA (2013). O método para o eutanásia destes animais foi a decapitação após anestesia geral com isoflurano (5% em 0,5 L/min de O₂) em sala distinta da qual os animais estavam mantidos, realizada por experimentador treinado.

As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos brancos próprios para descarte de material biológico e armazenadas em freezer em uma câmara de congelamento científica com temperatura -20° C, da UEA/HCPA, até o recolhimento pela empresa responsável.

6.6.Obtenção das Peças Maxilares e Análise Morfométrica da Perda Óssea Alveolar

As hemi-maxilas superiores do lado direito dos animais foram coletadas logo após a eutanásia. As análises morfométricas destas peças foram realizadas no Laboratório de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFRGS e seguiram a metodologia proposta por (Fernandes, et al. 2007). Essas maxilas foram imersas em hipoclorito de sódio a uma concentração de 9% de cloro ativo, durante duas horas e os tecidos moles mecanicamente removidos. Passado este período, as peças foram lavadas e secas. Para a

tomada das fotografias, foi utilizada uma câmera fotográfica digital de 6.1 megapixels modelo D100, com lente macro 100 (Nikon® Coolpix, Ayutthaya, Tailândia), acoplada a um tripé com distância focal mínima, de modo que o cone ficava o mais paralelo possível em relação ao solo.

Foi confeccionado um aparato utilizando pasta pesada de Silicona de Adição para promover fixação de uma régua endodôntica a uma posição perpendicular em relação ao solo. As peças foram fixadas à régua com lâmina de cera 07, de modo que o plano oclusal da peça ficasse paralelo ao solo. Foram realizadas fotografias das faces vestibular e palatina das maxilas do lado direito (hemimaxilas) sendo que a medida da distância da junção amelo-cementária à crista óssea foi feita através programa ImageJ(National Institutes of Health, MD, EUA), por dois examinadores treinados e que desconheciam a que grupo experimental pertenciam os espécimes.

A análise morfométrica permite a mensuração da perda óssea alveolar, tanto por vestibular quanto por palatino. A mensuração foi feita em regiões distintas somente do segundo molar (região que foi colocada a ligadura), sendo elas: duas na raiz mesial, duas na distal e uma na região da furca (central). A perda óssea do dente segundo molar (lado vestibular + lado palatino) foi gerada a partir da média dessas medidas lineares. Sendo assim, a distância entre a junção amelo-cementária e a crista óssea será o indicador de progressão de perda óssea (doença periodontal), ou seja, quanto maior a distância entre eles maior será a gravidade da doença.

6.7.Futuras Análises

Também foram coletados amostras de gengiva, língua e fígado, assim como a hemi-maxila superior esquerda dos animais. Os tecidos gengivais ao redor dos segundos molares superiores do lado direito foram removidos e lavados com solução salina fria (0,9%), triturados e homogeneizados em 300 mL de tampão contendo inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após isso, foram centrifugados por 10 minutos a cada 10.000 g. O total

de proteínas extraídas serão medidas por colorimetria usando kit de análise de proteína específica. O tecido sobrenadante foi congelado a -80°C até o momento dos ensaios laboratoriais.

Além disso, foram realizados imediatamente após a morte dos animais os procedimentos de preparo das peças anatômicas para posterior análise histológica e imunohistoquímica/fluorescência. As maxilas do lado esquerdo superior dos animais foram removidas cuidadosamente para que todos os tecidos (moles e duros) permaneçam íntegros para avaliação histológica. As peças foram armazenadas em potes contendo solução de formalina tamponada a 10%, devidamente etiquetados com o número do animal e grupo ao qual pertencia. Após 48 horas, as peças foram colocadas em ácido cítrico por um período médio de 5 dias. As línguas também foram fixadas em solução de formalina a 10% tamponada por até 48 horas. O material foi enviado ao Laboratório de Patologia Experimental do HCPA onde foi processado e imerso em parafina utilizando-se os procedimentos de rotina histopatológica. Análises futuras serão realizadas no Laboratório de Biologia Epitelial da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan (EUA). Salienta-se que já existe o vínculo do orientador desse estudo com o referido laboratório, uma vez que esse foi o local de seu pós-doutoramento.

7.CONTROLE DE QUALIDADE DO ESTUDO

O presente estudo seguiu as recomendações do ARRIVE (Guidelines for Reporting Animal Research) para experimentação animal (Kilkenny, Browne et al. 2010).

O cegamento dos pesquisadores aconteceu no momento da análise morfométrica/laboratorial. As peças foram codificadas, por um examinador externo ao estudo e nomeadas de acordo com esse código, de modo que o examinador que fez a análise das fotografias não sabia a que grupo cada espécime pertencia.

Após a análise morfométrica, todos os dados dos dois examinadores foram comparados pelo teste do Coeficiente de Correlação Intra-classe (CCI). O resultado indicou uma boa correlação entre os examinadores (CCI=0,89).

8. ANÁLISE DOS DADOS

8.1. Hipótese estatística

A hipótese de nulidade a ser testada estatisticamente é a de que não existe nenhuma diferença entre os grupos experimentais para os desfechos primários e secundários. A hipótese experimental é de que pelo menos um dos grupos é estatisticamente diferente dos demais.

8.2. Análise estatística

Foi verificada a distribuição dos dados por meio da avaliação de histogramas e pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A análise estatística foi realizada conforme segue:

- Medidas de tendência central e de dispersão dos dados referentes ao peso dos animais, consumo de alimentos e bebidas e perda óssea alveolar foram realizadas e comparadas entre os grupos experimentais. O teste *Post Hoc* foi aplicado conforme necessidade e distribuição amostral. O nível de significância assumido foi de $P \leq 0,05$.
- Para definição da ocorrência de periodontite entre os grupos experimentais, foi atribuído um ponto de corte para a perda óssea alveolar, conforme ordenamento das medidas de todos os grupos experimentais. O ponto de corte atribuído refere-se ao percentil 75%.

9.RESULTADOS

Após a pesagem inicial individual, os ratos foram ordenados e numerados do menor ao maior peso. Em seguida, os ratos foram randomizados em 8 grupos experimentais de acordo com o programa “Random.org”. O peso médio (\pm desvio padrão) dos diferentes grupos experimentais está representado na figura 2. Ao início do estudo, o peso dos animais variou entre 278,33 (\pm 24,6) e 315,98 (\pm 23,07) gramas, não apresentando diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p=0.06$). Ao longo do estudo, também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais em relação ao peso. Apenas pode-se observar diferenças no ganho de peso dentro do mesmo grupo, em todos os grupos experimentais, ao longo das 6 semanas (ANOVA de medidas repetidas, $p=0.001$). Ao término da fase experimental, o peso médio dos grupos variou entre 401,71 (\pm 38,9) e 450,17 (\pm 45,08) gramas (ANOVA, $p=0.21$).

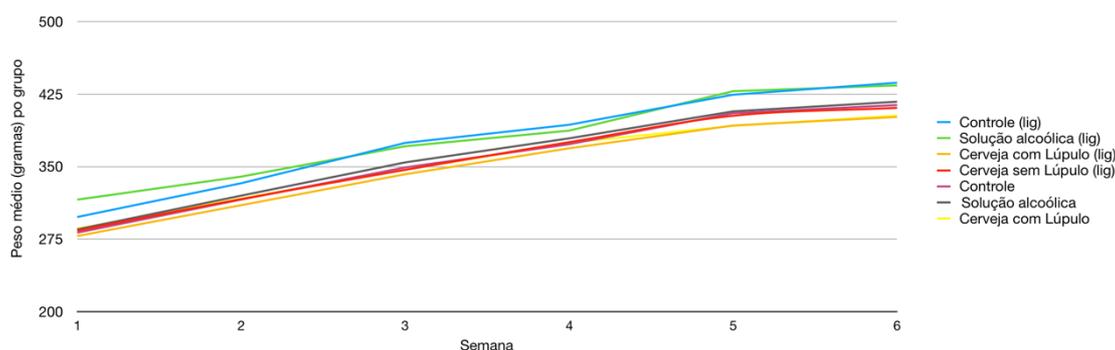


Figura 2. Peso médio (g) em cada grupo experimental ao longo período experimental.

O consumo de líquidos durante o ciclo escuro (12 horas) foi mensurado diariamente em mililitros (mL) ao longo de toda a fase experimental (figura 3). No primeiro dia do estudo, o consumo médio de líquido estimado variou entre 23,75 e 46,25 mL por animal. Interessantemente, após a colocação das ligaduras, todos os grupos experimentais apresentaram uma queda no consumo das bebidas. Entretanto, em nenhum momento houve diferenças significativas no padrão de consumo dos diferentes insumos entre os grupos, nem mesmo ao longo do tempo (ANOVA de medidas repetidas). Ao término

do período experimental, o consumo médio estimado por animal/dia variou entre 40,62 e 53,15 mL.

Também foi estimada a quantidade de álcool ingerida por animal/dia ao longo de toda a fase experimental. No início do estudo, o consumo estimado de álcool variou entre 1,31 e 2,16 gramas por animal/dia e ao término do estudo o consumo estimado por animal/dia variou de 1,89 a 2,36 gramas. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais (ANOVA), nem mesmo ao longo do tempo (ANOVA de medidas repetidas).

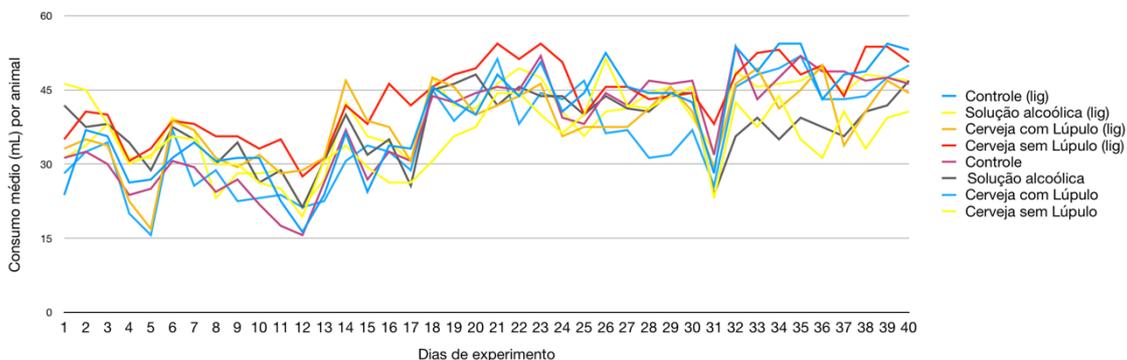


Figura 3. Consumo médio de líquido estimado (em mililitros) por animal de acordo com o grupo experimental ao longo de toda fase experimental.

O consumo de alimentos em gramas (g) foi avaliado a cada dois dias durante todo o período experimental e está representado na figura 4. Ao início do estudo, a estimativa do consumo médio variou entre 18,97 e 24,50 gramas/dia por animal. Ao fim do período experimental, o consumo médio variou de 16,66 a 24,95 gramas/dia por animal. Não foram observadas diferenças significativas para o consumo de ração em nenhum momento da fase experimental entre os grupos experimentais (ANOVA), nem mesmo ao longo do tempo (ANOVA de medidas repetidas).

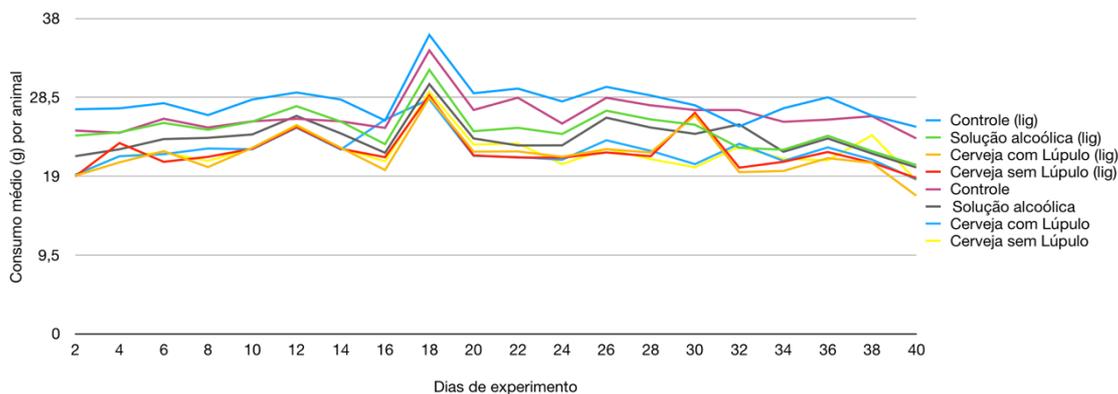


Figura 4. Consumo médio de ração estimado (em gramas) por animal de acordo com o grupo experimental ao longo de toda fase experimental

Tabela 1. Perda óssea alveolar média em milímetros (\pm desvio padrão) entre os diferentes grupos experimentais estratificada pela presença ou não de ligadura.

Grupos	Com Ligadura			Sem Ligadura		
	Vestibular	Palatina	Dente	Vestibular	Palatina	Dente
Controle	0,40 (\pm 0,03) ^a	0,59 (\pm 0,05) ^a	0,49 (\pm 0,03) ^a	0,25 (\pm 0,03) ^a	0,48 (\pm 0,05) ^a	0,37 (\pm 0,02) ^a
Solução Alcoólica	0,36 (\pm 0,07) ^a	0,58 (\pm 0,04) ^a	0,47 (\pm 0,05) ^a	0,26 (\pm 0,05) ^a	0,48 (\pm 0,04) ^a	0,37 (\pm 0,02) ^a
Cerveja com Lúpulo	0,37 (\pm 0,03) ^a	0,49 (\pm 0,05) ^b	0,43 (\pm 0,03) ^b	0,26 (\pm 0,03) ^a	0,41 (\pm 0,05) ^b	0,34 (\pm 0,03) ^a
Cerveja sem Lúpulo	0,33 (\pm 0,04) ^a	0,53 (\pm 0,05) ^a	0,43 (\pm 0,03) ^b	0,24 (\pm 0,04) ^a	0,48 (\pm 0,07) ^a	0,36 (\pm 0,02) ^a
<i>P'</i>	0.08	0.001	0.006	0.56	0.01	0.08

*ANOVA: letras distintas significam diferenças estatísticas entre o grupo experimental e o controle.

A análise de perda óssea alveolar (POA) foi avaliada por meio de estratificações conforme grupo experimental, presença ou não da ligadura, distribuídas nas diferentes faces/dentes (Tabela 1). Pode-se observar que para os grupos com ligadura, as menores médias de POA estão nos grupos que foram expostos a cerveja, especialmente no que se refere a face palatina ($p < 0.01$) e a média de POA no dente ($p < 0.01$). Já na comparação entre os grupos que não receberam ligadura, a média de POA foi estatisticamente menor somente na face palatina do grupo cerveja com lúpulo ($p = 0.01$), quando comparada ao controle.

Tabela 2. Ocorrência de periodontite de acordo com os diferentes grupos experimentais após definição do ponto de corte (POA \geq 0,51 mm).

Definição de Doença	GRUPOS				Total
	Controle	Solução Alcoólica	Cerveja com Lúpulo	Cerveja sem Lúpulo	
Sem Periodontite	23	22	30	21	96
Com Periodontite	9	10	2*	11	32
Total	32	32	32	32	128

*Teste exato de Fisher, $p=0.02$ (post-hoc: resíduos ajustados)

A tabela de contingência 2 mostra a ocorrência de periodontite após definição do ponto de corte para a presente amostra. Essa definição se deu após ranqueamento da média da POA, da menor para o maior. O ponto de corte escolhido foi o percentil 75%. Portanto, toda face que apresentava um valor médio de POA superior ou igual a 0,51 mm, foi considerado como doente (periodontite). Sendo assim, pode-se observar que os ratos expostos a cerveja com lúpulo apresentaram uma menor ocorrência de periodontite quando comparado aos demais grupos experimentais (teste exato de Fisher, $p=0.02$; post-hoc: resíduos ajustados).

10.DISCUSSÃO

O presente estudo traz uma abordagem sobre o consumo de cerveja (rica ou não em lúpulo) e de uma solução alcoólica com mesma concentração de álcool sobre a perda óssea alveolar induzida (ou não) por meio de ligadura. Os resultados mostram um desfecho de proteção à destruição óssea, especialmente a favor do grupo exposto a cerveja rica em lúpulo, tanto na ausência quanto na presença da ligadura. Os resultados são corroborados de forma semelhante quando a análise de ocorrência de periodontite foi realizada. Já a solução alcoólica *per se* não interferiu nos resultados.

Existe na literatura alguns estudos que já abordaram o consumo de alguns insumos que utilizam álcool na sua composição sobre a doença periodontal/periodontite. De uma maneira geral, os estudos mostram resultados divergentes. Muito disso se deve ao fato da utilização de diversas doses/concentrações, assim como da utilização de diferentes tipos de bebidas e das variadas definições do que é doença periodontal. Interessantemente, os achados a respeito do tema têm reportado um efeito do álcool sobre o periodonto em forma de curva “J”, assim como ocorre na literatura médica. Por exemplo, estudos que utilizaram baixas doses/concentrações de álcool têm encontrado resultados positivos sobre a perda óssea alveolar (Oballe et al., 2014; Liberman et al., 2011). Já aqueles que usam altas doses/concentrações, encontram efeitos deletérios sobre as estruturas periodontais (Irie et al., 2008; Souza et al., 2006). Esses achados também têm sido encontrados e corroborados em levantamentos epidemiológicos transversais e longitudinais (Pitiphat et al., 2003; Nishida et al., 2010; Susin et al., 2015; Wagner et al., 2017), dando consistência ao que foi encontrado. De qualquer forma, no presente estudo, a solução alcoólica pura não foi capaz de prevenir perda óssea alveolar nem mesmo reduzir a ocorrência de periodontite, diferentemente de outros estudos (Oballe et al., 2014; Liberman et al., 2011). Além disso, esse estudo não se propôs a estudar os possíveis efeitos de dose e resposta sobre o periodonto. Apenas sugere-se que há um efeito em curva “J” quando se analisa a literatura.

A proposta do presente estudo foi de mimetizar o consumo baixo/moderado de álcool durante toda a fase experimental da pesquisa. Para isso, proveu-se a bebida somente durante o período de ciclo escuro (12 horas) dos animais. Esse acesso limitado garantiu um consumo estimado que variou durante toda a pesquisa de 1,31 a 2,36 gramas por animal/dia. De acordo com outros estudos, a ingestão diária de no máximo 4g/dia de álcool corresponde a um consumo baixo/moderado em modelos animais como o rato (Pautassi et al., 2011; Probyn et al., 2013). Outros pontos fortes também devem ser destacados, como randomização da amostra, cegamento pré-mensuração da perda óssea alveolar, reprodutibilidade dos achados e monitoramento diário do consumo de líquidos. Soma-se a isso todos os cuidados com a manutenção da refrigeração das cervejas pré-consumo e a troca diária por um novo produto afim de evitar oxidação e perda dos princípios ativos.

Os possíveis eventos biológicos que melhor explicam esses achados ainda são pouco estudados na odontologia. A maior parte da literatura que pode sustentar esses achados advém da literatura médica, que encontra resultados semelhantes, especialmente sobre os eventos cardiovasculares quando existe um baixo/moderado consumo de bebidas como o vinho ou cerveja. Pesquisas têm demonstrado que os polifenóis encontrados na cerveja, quase exclusivamente nas que contém lúpulo, atuam sobre biomarcadores de estresse oxidativo, revelando que essas bebidas exercem um papel protetivo contra danos no DNA (Rivero et al., 2005; Tedesco et al., 2005). De forma consistente, estudos mostram que existem efeitos de proteção relacionados ao consumo baixo/moderado de cerveja em relação ao perfil lipídico de adultos jovens (25-50 anos) (Romeo et al., 2008). Resultados semelhantes relacionados ao perfil lipídico e biomarcadores de estresse oxidativo também já foram observados em população mais velha (58-73 anos) (Martínez- Álvarez et al., 2009). Além disso, estudos vêm demonstrando que o conteúdo fenólico da cerveja é capaz de reduzir o nível de moléculas envolvidas em leucócitos e biomarcadores de adesão, como E-selectina, IL-6 e IL-15, entre outros. Isso é uma clara contribuição da cerveja na redução dos níveis plasmáticos de alguns biomarcadores inflamatórios associados a

doenças cardiovasculares (Chiva- Blanch et al. (2015). Outra característica importante da cerveja rica em polifenóis sobre a inflamação está na sua ação que envolve sua capacidade de inibir a enzima sintase de óxido nítrico induzível (iNOS), além da inibição de enzimas como a ciclooxigenase (COX-1) (Milligan et al., 2000; Arranz et al., 2012). Sendo assim, é possível transpor da literatura médica que o consumo de cerveja rica em polifenóis possa estar modulando a inflamação periodontal.

Entretanto, o consumo por via oral dos insumos não permite avaliar se o efeito protetor que a cerveja está exercendo sobre o periodonto é de origem sistêmica, tópica ou se existe um sinergismo de ambos. Há relatos na literatura que o álcool/polifenóis podem ser capazes de tal feito, especialmente pelo controle do crescimento e presença de determinadas bactérias na boca (Thomas et al., 2014; Jabbour et al., 2013) e pela atuação sistêmica sobre mediadores inflamatórios (Tverdar et al., 2017). Por outro lado, peças anatômicas do fígado e da gengiva foram congelados para avaliação de estresse oxidativo e de outros marcadores inflamatórios no futuro. Essa análise irá com certeza contribuir para um melhor entendimento sobre a origem da proteção desses tecidos periodontais.

O modelo de disponibilidade de bebida em “mamadeira” que foi utilizado nesse estudo não permite estabelecer o consumo exato de bebida por animal, apenas uma estimativa do que foi consumido. De qualquer forma, o consumo nos mais diferentes grupos experimentais mostrou-se muito semelhante ao longo de todo o estudo, não apresentando nenhuma diferença significativa entre os grupos. Assim como o consumo de bebida, não é possível estabelecer com precisão o consumo de ração por animal. Mesmo assim, o ganho médio de peso entre os grupos experimentais expostos as bebidas alcoólicas manteve-se sem diferenças significativas quando comparados ao grupo controle ao longo de todo estudo.

As cervejas consumidas pelos animais foram produzidas pela empresa Estilingue Cervejaria LTDA e seguem os mais rígidos princípios de produção e qualidade do produto. Muito embora as informações nutricionais do produto sejam conhecidas, amostras do produto foram guardadas para futura

realização de espectrofotometria por empresa externa ao estudo. Essa análise vai poder apurar com precisão a presença da quantidade de polifenóis, teor alcoólico e presença de proteínas nos diferentes produtos, agregando confiabilidade nos achados para futura publicação.

Apesar do modelo de indução de perda óssea alveolar por meio de ligadura em roedores estar consagrado na literatura, diferentes tempos de permanência da ligadura, além da sua presença em diferentes dentes/arcadas estão reportados. No presente estudo foram utilizados os segundos molares superiores para indução da perda óssea alveolar. Esse dente foi escolhido devido ao fato de que os autores possuem experiência na sua colocação, além de diversos estudos já publicados (Oballe et al., 2014; Liberman et al., 2011, Cavagni et al. 2016, Fernandes et al., 2010). Entretanto, o tempo de permanência da ligadura por 10 dias foi um fato novo nesse estudo. Isso se explica uma vez que a presença de ligadura é capaz de promover uma determinada destruição dos tecidos de suporte do dente, como o osso. Após esse período, parece haver uma estabilidade na perda do tecido ósseo. Recentemente, um estudo corrobora com esse pensamento, mostrando claramente que após o 15º dia da colocação da ligadura não há ganhos adicionais importantes na destruição óssea. Isso significa dizer estudos sobre a modulação da destruição dos tecidos periodontais podem ser melhor visualizadas dentro desse período inicial de 15 dias (Vargas-Sanchez et al., 2017).

Cabe ainda ressaltar que não existe uma definição clara na literatura sobre o que é periodontite em modelo animal. Afim de ajudar nesse importante ponto, foi proposto uma análise de ocorrência de periodontite baseada no ranqueamento de todas as medidas de perda óssea alveolar. Após isso, foi criado de um ponto de corte baseado no percentil 75%, ponto esse bastante usado em modelos estatísticos epidemiológicos e clínicos (Demmer et al., 2012; Xiong et al., 2009). Esse modo de inferir periodontite tem sido bastante utilizado pelo grupo e tem sido bem aceito no meio acadêmico (Cavagni et al., 2013; Oballe et al., 2014). O estabelecimento de um ponto de corte permite associar os casos de maior severidade de doença com diferentes variáveis.

11. CONCLUSÕES

O presente estudo buscou elucidar um assunto até então não abordado pela literatura, que é o efeito da cerveja rica em lúpulo sobre a perda óssea alveolar em modelo animal. Diante dos resultados, parece ficar claro que existe sim um efeito protetor do consumo desse produto, quando em doses baixas/moderadas, sobre o tecido ósseo adjacente ao dente. Esses achados estão de acordo com diversos estudos, inclusive com consensos e meta-análises, que avaliam o efeito protetor do consumo de baixas/moderadas doses de vinho/cerveja sobre eventos cardiovasculares.

As prováveis vias biológicas ativadas para tal efeito protetor reportadas na literatura referenciam o potente efeito anti-inflamatório que os polifenóis possuem. Para ajudar nesse entendimento, análises de marcadores inflamatórios locais (gengiva) e sistêmicos (fígado) serão avaliados no futuro. Além disso, a regulação de vias epigenéticas por meio de imunofluorescência também serão realizadas nas maxilas que foram processadas e armazenadas em parafina. Os prováveis marcadores moleculares que serão utilizados para melhor compreensão dos achados serão aqueles que avaliam a (des)ativação da acetilação de histonas 3 e 4, bem como de marcadores associados a regulação da inflamação a nível de DNA, como o BRD4, G9a, NFkB, Sirtuína 1, entre outras.

Cabe aqui também ressaltar que esse é um estudo experimental sem aplicação clínica e que não tem por objetivo fazer recomendação do uso de cerveja de forma terapêutica em nenhuma situação. Os autores entendem que o consumo de bebida alcoólica de maneira indiscriminada pode levar a importantes eventos deletérios sobre a saúde do indivíduo e a sociedade. Ademais, estudos para melhor compreender os mecanismos biológicos ainda são escassos, além do que estudos clínicos são inexistentes sobre o tema dessa dissertação. Isso significa dizer que o nível de evidência ainda é baixo e a discussão deve ficar tão somente no meio acadêmico.

Portanto, diante do presente estudo pode-se concluir que o consumo de doses baixas/moderadas de cerveja enriquecida com lúpulo parece trazer um efeito protetor sobre a perda óssea alveolar induzida ou não por meio de

ligadura em modelo animal. Além disso, a presença de lúpulo na cerveja pode ser benéfica na diminuição da ocorrência de periodontite experimental. De forma isolada, baixas/moderadas doses de álcool não apresentaram nenhum efeito sobre o tecido ósseo.

12.REFERÊNCIAS

Al-Mousawi AM, Kulp GA, Branski LK, Kraft R, Mecott GA, Williams FN, et al. Impact of anesthesia, analgesia and euthanasia technique on the inflammatory cytokine profile in a rodent model of severe burn injury. *Shock*. 2010;34(3):261-8.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(17): 7915-7922.

Arranz S, Chiva-Blanch G, Valderas-Martinez P, Medina-Remon A, Lamuela-Raventos RM, Estruch R. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. *Nutrients*. 2012;4(7):759-81.

Aquarone E, Borzani W, Schmidell W, Lima UD. A. (2001). *Biotechnologia Industrial: Biotechnologia na produção de alimentos*, Vol. 4. São Paulo: Editora Edgard Blücher.

Bartold PM, Van Dyke TE. Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts. *Periodontol* 2000. 2013;62(1):203-17.

Beer Judge Certification Program (BJCP). 2008. Style Guideline. Disponível em: <http://www.bjcp.org/docs/2008_Guidelines.pdf> Acesso em: 2 fevereiro. 2017.

Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*. 1993;28(6 Pt 2):500-10.

Bittencourt Pasquali MA, Gelain DP, Zeidán-Chuliá F, Pires AS, Gasparotto J, Terra SR, Moreira JCF. Vitamin A (retinol) downregulates the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) by oxidant-dependent activation of p38 MAPK and NF- κ B in human lung cancer A549 cells. *Cellular Signalling*. 2013;25(4): 939-954.

Botelho BG. (2009). Perfil e teores de aminos bioativas e características físico-químicas em cervejas [Dissertação Mestrado]. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.2009.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 1998;56(11): 317-333.

Campus G, Salem A, Uzzau S, Baldoni E, Tonolo G. Diabetes and periodontal disease: a case–control study. *J Periodontol*. 2005; 76: 418-25.

Carvajal P, Gomez M, Gomes S, Costa R, Toledo A, Solanes F, et al. Prevalence, severity, and risk indicators of gingival inflammation in a multi-center study on South American adults: a cross sectional study. *J Appl Oral Sci*. 2016;24(5):524-34.

Cavagni J, de Macedo IC, Gaio EJ, Souza A, de Molon RS, Cirelli JA, et al. Obesity and Hyperlipidemia Modulate Alveolar Bone Loss in Wistar Rats. *J Periodontol*. 2016;87(2):e9-17.

Cavagni J, Wagner TP, Gaio EJ, Rêgo ROCC, Torres ILS , Rösing CK. Obesity may increase the occurrence of spontaneous periodontal disease in Wistar rats. *Arch Oral Biol.* 2013;58(8):1034-9.

Ceh B, Kac M, Košir IJ, Abram V. Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and cultivar. *International Journal of Molecular Sciences* 2007;8(9), 989-1000.

Chen H, Liu N, Xu X, Qu X, Lu A. E. Smoking, Radiotherapy, Diabetes and Osteoporosis as Risk Factors for Dental Implant Failure: A Meta-Analysis. *PLoS ONE.* 2013;8(8):e71955.

Chen W, Becker T, Qian F, Ring J. Beer and beer compounds: Physiological effects on skin health. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2014;28(2): 142-150.

Chiva-Blanch G, Magraner E, Condines X, Valderas-Martinez P, Roth I, Arranz S, et al. Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: a randomized feeding trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015;25(1):36-45.

Classen W. Chapter 21 - Behaviour, Neurology and Electrophysiology A2 - Krinke, Georg J. *The Laboratory Rat.* London: Academic Press; 2000. p. 419-35.

Colgrave ML, Goswami H, Howitt CA, Tanner GJ. Proteomics as a tool to understand the complexity of beer. *Food Research International*. 2013;54(1): 1001-1012.

Cooper TJ. Medical considerations of moderate alcohol consumption In *Proceedings Of The Convention-Institute Of Brewing Australia And New Zealand Section*.;1994 (Vol. 23, pp. 32-32).

Coutinho CAT, Quintella C, Panzani M. A história da cerveja no brasil. v. 5. *Cervesia*.;2008. Disponível em: <<http://www.cervesia.com.br/historia-da-cerveja/72-a-historia-da-cerveja-no-brasil.html>>. Acesso em: 03 janeiro. 2017.

Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME, Resende MP, et al. Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1996;63(2): 220-224.

Cruz JMM, Pinheiro JL, de Amorim SM, Kuglin VB. Produção de Cerveja. *Reactores Biológicos-Fundamentos e Aplicações*. 2007;277-305.

Darby WJ, Ghalioungui P, Grivetti L, Darby WJ. Food: the gift of Osiris. 1977;v.2, pp. 691-695). London: Academic Press.

Demmer RT, Squillaro A, Papapanou PN, Rosenbaum M, Friedewald WT, Jacobs Jr DR et al. Periodontal infection, systemic inflammation, and insulin resistance: results from the continuous National Health and Nutrition

Examination Survey (NHANES) 1999–2004. *Diabetes Care*. 2012;35:2235–42.

Devi PB, Vijayabharathi R, Sathyabama S, Malleshi NG, Priyadarisini VB. Health benefits of finger millet (*Eleusine coracana* L.) polyphenols and dietary fiber: a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2014;51(6): 1021-1040.

Di Castelnuovo A, Costanzo S, di Giuseppe R, de Gaetano G, Iacoviello L. Alcohol consumption and cardiovascular risk: mechanisms of action and epidemiologic perspectives. *Future Cardiol*. 2009;5(5):467–77.

Dimmitt SB, Rakic V, Puddey IB, Baker R, Oosttryck R, Adams M J, et al. The effects of alcohol on coagulation and fibrinolytic factors: a controlled trial. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 1998;9(1): 39-46.

Diretrizes brasileiras para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos - DBCA. 50 p. 2013.

Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA. Brasília, DF: 54 p. 2013.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 2002;82(1): 47-95.

Feinleib M. Seven Countries: A Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease. 1981. 511 p.

Fernandes MI, Gaio EJ, Oppermann RV, Rados PV, Rosin CK. Comparison of histometric and morphometric analyses of bone height in ligature-induced periodontitis in rats. *Braz Oral Res*. 2007;21(3):216-21.

Fernandes MI, Gaio EJ, Susin C, Rosing CK, Oppermann RV, Rados PV. Effect of nifedipine on gingival enlargement and periodontal breakdown in ligature-induced periodontitis in rats. *Arch Oral Biol.* 2010;55(7):523-9.

de Gaetano G, Costanzo S, Di Castelnuovo A, Badimon L, Bejko D, Alkerwi A, et al. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016;26(6):443-67.

Garcia CC. Retórica e Cenário Microcervejeiro nas Regiões Sul e Sudeste. Faculdade de Tecnologia de Araçatuba. Curso de Tecnologia em Biocombustíveis. Araçatuba, SP.;2012

Georgiev V, Ananga A, Tsoleva V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. *Nutrients.* 2014;6(1): 391-415.

Gerhäuser C.. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer.*2005: 41(13):1941-1954.

González-Gros M, Lebrón MR, Marcos A. Revisión bibliográfica sobre los efectos del consumo moderado de cerveza sobre la salud. Ed. Centro de Información cerveza y salud. Madrid.;2000. Disponível em: <<http://www.cervezaysalud.org>>. Acesso em: 20 dezembro 2016.

Gresele P, Cerletti C, Guglielmini G, Pignatelli P, de Gaetano G, Violi F. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: anupdate. *J NutrBiochem.* 2011;22(3):201–11.

Guentsch A, Puklo M, Preshaw PM, Glockmann E, Pfister W, Potempa J, et al. Neutrophils in chronic and aggressive periodontitis in interaction with

Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans. J Periodontal Res. 2009;44(3):368-77.

Halliwel B. Dietary polyphenols: good, bad, or indifferent for your health? Cardiovascular Research. 2007;73(2): 341-347.

Hendriks HF, Veenstra J, Velthuis-te Wierik EJ, Schaafsma G, Klufft C. Effect of moderate dose of alcohol with evening meal on fibrinolytic factors. BMJ. 1994;308(6935): 1003-1006.

Hendriks HF, Veenstra J, Van Tol A, Groener J. E., Schaafsma, G. Moderate doses of alcoholic beverages with dinner and postprandial high density lipoprotein composition. Alcohol and Alcoholism. 1998;33(4), 403-410.

Hornsey IS. Brewing. The Royal Society of Chemistry, Cap. 2: Malting.;1999

Ikawa M, Okazawa H, Kudo T, Kuriyama M, Fujibayashi Y, Yoneda M. Evaluation of striatal oxidative stress in patients with Parkinson's disease using [62 Cu] ATSM PET. Nuclear Medicine and Biology. 2011;38(7): 945-951.

Imhof A, Froehlich M, Brenner H, Boeing H, Pepys MB, Koenig W. Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. The Lancet. 2001;357(9258): 763-767.

Inaba H, Tagashira M, Kanda T, Ohno T, Kawai S, Amano A. Apple- and hop-polyphenols protect periodontal ligament cells stimulated with enamel matrix derivative from Porphyromonas gingivalis. J Periodontol. 2005;76(12):2223-9.

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

Jabbour Z, Nascimento Cd, Kotake BGdS, El-Hakim M, Henderson JE, de Albuquerque Junior RF. Assessing the oral microbiota of healthy and alcohol-treated rats using whole-genome DNA probes from human bacteria. *Archives of Oral Biology*. 2013;58(3):317-23.

Johnson GK, Hill M. Cigarette smoking and the periodontal patient. *J Periodontol*. 2004;75(2):196-209.

Joshi KJ, Ascherio A, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, et al. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. *Jama*. 1999;282(13), 1233-1239.

Kapp JM, Austin Boren S, Yun S, LeMaster J. Diabetes and Tooth Loss in a National Sample of Dentate Adults Reporting Annual Dental Visits. *Preventing Chronic Disease*. 2007;4(3):A59.

Keisari Y, Braun L, Flescher E. The oxidative burst and related phenomena in mouse macrophages elicited by different sterile inflammatory stimuli. *Immunobiology*. 1983;165(1), 78-89.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother*. 2010;1(2):94-9.

Kimura T, Iwasaki N, Yokoe JI, Haruta S, Yokoo Y, Ogawara KI, et al. Analysis and prediction of absorption profile including hepatic first-pass metabolism of N-methyltyramine, a potent stimulant of gastrin release present in beer, after oral ingestion in rats by gastrointestinal-transit-absorption model. *Drug Metabolism and Disposition*. 2000;28(5): 577-581.

Konstantinidis IK, Kotsakis GA, Gerdes S, Walter MH. Cross-sectional study on the prevalence and risk indicators of peri-implant diseases. *Eur J Oral Implantol.* 2015;8(1):75-88.

Kou Y, Inaba H, Kato T, Tagashira M, Honma D, Kanda T, et al. Inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles are inhibited by hop-associated polyphenols. *J Periodontol.* 2008;79(1):174-80.

Lai PC, Ho W, Jain N, Walters JD. Azithromycin concentrations in blood and gingival crevicular fluid after systemic administration. *J Periodontol.* 2011;82(11):1582-6.

Liberman DN, Pilau RM, Orlandini LF, Gaio EJ, Rösing CK. Comparison of two methods for alveolar bone loss measurement in an experimental periodontal disease model in rats. *Braz Oral Res.* 2011;25(1):80-4.

Marmot MG, Rose G, Shipley MJ, Thomas BJ. Alcohol and mortality: a U-shaped curve. *Lancet.* 1981;317:580–3.

Martinez N, Urpi-Sarda M, Martinez-Gonzalez MA, Andres-Lacueva C, Mitjavila MT. Dealcoholised beers reduce atherosclerosis and expression of adhesion molecules in apoE- deficient mice. *Br J Nutr.* 2011;105(5):721–30.

Martinez Alvarez JR, Belles VV, Lopez-Jaen AB, Marin AV, Codoner-Franch P. Effects of alcohol-free beer on lipid profile and parameters of oxidative stress and inflammation in elderly women. *Nutrition.* 2009;25(2):182-7.

Milligan SR, Kalita JC, Pocock V, Van De Kauter V, Stevens JF, Deinzer ML, et al. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(12):4912-5.

Monteiro R, Becker H, Azevedo I, Calhau C. Effect of hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids on aromatase (estrogen synthase) activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2006;54(8): 2938-2943.

Morrone Mda S, Schnorr CE, Behr GA, Gasparotto J, Bortolin RC, da Boit Martinello K, et al. Curcumin Supplementation Decreases Intestinal Adiposity Accumulation, Serum Cholesterol Alterations, and Oxidative Stress in Ovariectomized Rats. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:5719291.

Motyl M . The absorption of xanthohumol in in vitro and in vivo studies and the investigation of the biological activity of structurally related chalcones [Doctoral dissertation]. Universität Regensburg.;2013. Disponível em: http://epub.uni-regensburg.de/26572/1/Magdalena_Motyl_Dissertation_BibExemplar.pdf.

Acesso em: 09 fevereiro. 2017

Negi R, Pande D, Karki K, Kumar A, Khanna RS, Khanna HD. Association of oxidative DNA damage, protein oxidation and antioxidant function with oxidative stress induced cellular injury in pre-eclamptic/eclamptic mothers during fetal circulation. *Chem Biol Interact.* 2014;208:77-83.

Negrão R, Costa R, Duarte D, Gomes TT, Coelho P, Guimarães JT, et al. Xanthohumol-supplemented beer modulates angiogenesis and inflammation in a skin wound healing model. Involvement of local adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry.* 2012;113(1):100-109.

Nelson ML, Dinardo A, Hochberg J, Armelagos GJ. Brief communication: mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350–550 CE. *American Journal of Physical Anthropology*. 2010;143(1):151-154.

Nishida N, Tanaka M, Sekine S, Takeshita T, Nakayama K, Morimoto K, et al. Association of ALDH2 genotypes with periodontitis progression. *J Dent Res*. 2010;89(2):138-42.

Nogueira LC. Estudo comparativo de caracterização e bioatividade de cerveja com e sem álcool[Tese Doutorado]. Instituto de Química. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro Campinas.; 2006.

Oballe HJR, Gaio EJ, Spuldaro T, Cavagni J, Gomez R, Rösing CK. Effects of Alcohol and/or Tobacco Exposure on Spontaneous Alveolar Bone Loss in Rat. *Brazilian Dental Journal*. 2014;25:197-202.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*. 1997;14:216-48.

Patil BS, Jayaprakasha GK, Chidambara Murthy KN, Vikram A. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009;57(18), 8142-8160.

Pautassi RM, Myers M, Spear LP, Molina JC, Spear NE. Ethanol induces second-order aversive conditioning in adolescent and adult rats. *Alcohol*. 2011;45(1):45-55.

Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000;63(7), 1035-1042.

Pinho RA, Andrades ME, Oliveira MR, Pirola AC, Zago MS, Silveira PC, et al. Imbalance in SOD/CAT activities in rat skeletal muscles submitted to treadmill training exercise. *Cell Biology International*. 2006;30(10):848-853.

Piazzon A, Forte M, Nardini M. Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *J AgricFoodChem*. 2010;58(19):10677–83.

Pinto C, Duque AL, Rodríguez-Galdón B, Cestero JJ, Macía P. Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2012;50(10):3405-3412.

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

Probyn ME, Parsonson KR, Gardebjær EM, Ward LC, Wlodek ME, Anderson ST, et al. Impact of low dose prenatal ethanol exposure on glucose homeostasis in Sprague-Dawley rats aged up to eight months. *PLoS One*. 2013;8(3):e59718.

Reidy J, McHugh E, Stassen LFA. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *The Surgeon*. 2011;9(5):278-283.

Rimm EB, Williams P, Fosher K, Criqui M, Stampfer MJ. Moderate alcohol intake and lower risk of coronary heart disease: meta-analysis of effects on lipids and haemostatic factors. *BMJ*. 1999;319(7224):1523–8.

Rivero D, Perez-Magarino S, Gonzalez-Sanjose ML, Valls-Belles V, Codoner P, Muniz P. Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: correlation with the content of polyphenols and melanoidins. *J Agric Food Chem*. 2005;53(9):3637-42.

Romeo J, Gonzalez-Gross M, Warnberg J, Diaz LE, Marcos A. Effects of moderate beer consumption on blood lipid profile in healthy Spanish adults. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008;18(5):365-72.

Romeo J, Warnberg J, Nova E, Diaz LE, Gomez-Martinez S, Marcos A. Moderate alcohol consumption and the immune system: a review. *Br J Nutr*. 2007;98 Suppl 1:S111-5.

Roy, P. Kulkarni, A. P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. *Food and Chemical Toxicology*. 1996;34(6):563-570.

Schnorr CE, da Silva Morrone M, Simões-Pires A, da Rocha RF, Behr GA, Moreira JCF. Vitamin A supplementation in rats under pregnancy and nursing induces behavioral changes and oxidative stress upon striatum and hippocampus of dams and their offspring. *Brain Research*. 2011;1369:60-73.

Sierksma A, Van Der Gaag MS, Klufft C, Hendriks HF. Moderate alcohol consumption reduces plasma C-reactive protein and fibrinogen levels; a randomized, diet-controlled intervention study. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2002;56(11):1130-1136.

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

Souza DM, Ricardo LH, Kantoski KZ, Rocha RF. Influence of alcohol consumption on alveolar bone level associated with ligature-induced periodontitis in rats. *Brazilian Oral Research*. 2009;23:326-32.

de Souza DM, Ricardo LH, Prado Mde A, Prado Fde A, da Rocha RF. The effect of alcohol consumption on periodontal bone support in experimental periodontitis in rats. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(6):443-7.

Stahl W, Sies H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes*. 1997;46(Supplement 2), S14-S18.

StLeger AS, Cochrane AL, Moore F. Ischemic heart disease and wine. *Lancet*. 1979;313:1294.

Susin C, Dalla Vecchia CF, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Periodontal attachment loss in an urban population of Brazilian adults: effect of

demographic, behavioral, and environmental risk indicators. *J Periodontol.* 2004;75(7):1033-41.

Susin C, Haas AN, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Gingival recession: epidemiology and risk indicators in a representative urban Brazilian population. *J Periodontol.* 2004;75(10):1377-86.

Susin C, Valle P, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Occurrence and risk indicators of increased probing depth in an adult Brazilian population. *J Clin Periodontol.* 2005;32(2):123-9.

Tedesco I, Nappo A, Petitto F, Iacomino G, Nazzaro F, Palumbo R, et al. Antioxidant and cytotoxic properties of lyophilized beer extracts on HL-60 cell line. *Nutr Cancer.* 2005;52(1):74-83.

Teyssen S, Lenzing T, Gonzalez-Calero G, Korn A, Riepl RL, Singer MV. Alcoholic beverages produced by alcoholic fermentation but not by distillation are powerful stimulants of gastric acid secretion in humans. *Gut.* 1997;40(1):49-56.

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

Tezal M, Grossi SG, Ho AW, Genco RJ. Alcohol consumption and periodontal disease. The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Periodontol.* 2004;31(7):484-8.

Thomas AM, Gleber-Netto FO, Fernandes GR, Amorim M, Barbosa LF, Francisco AL, et al. Alcohol and tobacco consumption affects bacterial richness in oral cavity mucosa biofilms. *BMC Microbiol.* 2014;14:250.

Tverdal A, Magnus P, Selmer R, Thelle D. Consumption of alcohol and cardiovascular disease mortality: a 16 year follow-up of 115,592 Norwegian men and women aged 40-44 years. *Eur J Epidemiol.* 2017;32(9):775-83.

Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology.* 2009;7(1), 65-74.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007;39(1), 44-84.

Van Cleemput M, Cattoor K, De Bosscher K, Haegeman G, De Keukeleire D, Heyerick A. Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *J Nat Prod.* 2009; 72(6):1220–30.

Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. *J Periodontol.* 2008;79(8 Suppl):1601-8.

Van der Gaag MS, van Tol A, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, et al. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis.* 1999;147(2):405-410.

Van der Gaag MS, Ubbink JB, Sillanaukee P, Nikkari S, Hendriks HF. Effect of consumption of red wine, spirits, and beer on serum homocysteine. *The Lancet.* 2000;355(9214):1522.

Van der Gaag MS, Van Tol A, Vermunt SHF, Scheek LM, Schaafsm G, Hendriks HFJ. Alcohol consumption stimulates early steps in reverse cholesterol transport. *Journal of Lipid Research*. 2001;42(12): 2077-2083.

Vargas-Sanchez PK, Moro MG, Santos FAD, Anbinder AL, Kreich E, Moraes RM, et al. Agreement, correlation, and kinetics of the alveolar bone-loss measurement methodologies in a ligature-induced periodontitis animal model. *J Appl Oral Sci*. 2017;25(5):490-7.

Vinson JA, Mandarano M, Hirst M, Trevithick JR, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003;51(18):5528-5533.

Wagner MC, Haas AN, Oppermann RV, Rosing CK, Albandar JM, Susin C. Effect of Alcohol Consumption on Clinical Attachment Loss Progression in an Urban Population From South Brazil: A 5-Year Longitudinal Study. *J Periodontol*. 2017;88(12):1271-80.

Wagner MC, Rocha JM, Gaio EJ, Cavagni J, Carrard VC, Rösing CK. Effect of 15% Alcohol Dependence on Alveolar Bone Loss and TNF- α Secretion in Wistar Rats. *Braz Dent J*. 2016;27(2):135-40.

Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The Lancet*. 1994;344 (8925):793-795.

Wright CA, Bruhn CM, Heymann H, Bamforth CW. Beer consumers' perceptions of the health aspects of alcoholic beverages. *Journal of Food Science*. 2008;73(1):H12-H17.

Xiong X, Elkind-Hirsch KE, Vastardis S, Delarosa RL, Pridjian G, Buekens P. Periodontal disease is associated with gestational diabetes mellitus: a case-control study. *Journal of Periodontology* 2009;80:1742-9.

Yokoo Y, Kohda H, Kusumoto A, Naoki H, Matsumoto N, Amachi T, Nukaya HA. Isolation from beer and structural determination of a potent stimulant of gastrin release. *Alcohol and Alcoholism*. 1999;34(2):161-168.

Zhao F, Nozawa H, Daikonnya A, Kondo K, Kitanak S. Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus* L.). *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2003;26(1): 61-65.