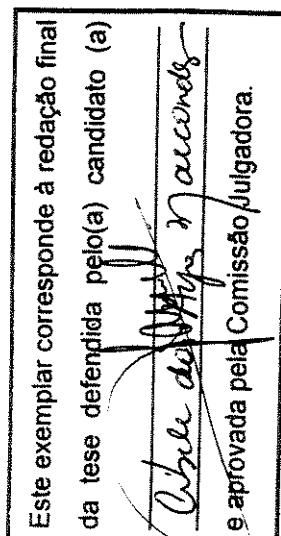


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



Cibele dos Anjos Marcondes

“O REPARO TECIDUAL DA MUCOSA BUCAL DE RATOS SUBMETIDOS AO ALCOOLISMO CRÔNICO EXPERIMENTAL”



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural na área de Histologia.

Orientador: Prof.Dr. José Angelo Camilli

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
 Nº CHAMADA T/UNICAMP
M333r
 V _____ EX _____
 TOMBO BC/ 49725
 PROC 16-837/02
 C _____ DX _____
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 18/06/02
 Nº CPD _____

CM00169268-0

BIB ID 244857

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

M333r

Marcondes, Cibeles dos Anjos

O reparo tecidual da mucosa bucal de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental/Cibeles dos Anjos Marcondes.--
 Campinas, SP:[s.n.], 2002

Orientador: José Ângelo Camilli

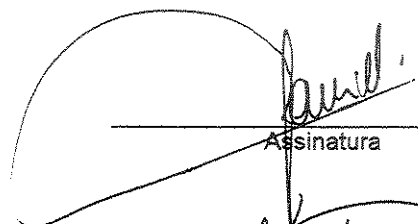
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia

1. Alcoolismo. 2. Mucosa bucal. I. Camilli, José Ângelo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 15/03/2002

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Angelo Camilli (Orientador)



Assinatura

Prof. Dr. Francisco Benedito Kuchinski



Assinatura

Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez



Assinatura

Prof. Dr. Silvio Boraks

Assinatura

18092002

Aos meus pais, Sílvio e Sidnéa

Aos meus irmãos Cilene, Cinara, Bianca e Vinícius.

À minha avó Anita,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo amor inesgotável e coragem de apoiarem todas as minhas decisões, dando-me amparo material e espiritual em todos os momentos da minha vida, principalmente nos mais difíceis.

À minha irmã Cilene, pelo amor, amizade, compreensão e suporte sem limites.

À minha irmã Cinara, pelo amor, incentivo e companheirismo constantes.

À minha irmã Bianca, pelo amor e por me ensinar que é preciso aprender a recomeçar todos os dias.

Ao meu irmão Vinícius, pelo amor e por me mostrar a todo o momento que devemos acreditar e investir no futuro.

À minha avó Anita, por ser exemplo de dignidade, generosidade e por ser tão maravilhosa.

À querida tia Aurinha pelo carinho e atenção.

Aos tios Haruki, Tute, Kazuê e aos primos Eduardo, Júlia e Gustavo, pelo amor e incentivo. Vocês são meu segundo lar.

Aos “tios” Nelson e Cleusa e aos “primos” Patrícia, Fábio e Maria Eugênia, minha gratidão, por terem me recebido como filha e irmã durante todo período em que estive em Campinas.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Angelo Camilli, pela oportunidade de realizar este curso e de aprender muito mais que confeccionar lâminas, fazer pesquisa bibliográfica e escrever de forma objetiva. Obrigada pela oportunidade de crescer.

Aos examinadores Prof. Dr. Francsico Benedito Kuchinski, Prof. Dr. Francisco Eduardo Martinez e Prof. Dr. Sílvio Boraks, pela orientação na finalização deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani e Prof. Dr. Flávio Ferrari Aragon, do Departamento de Bioestatística - IB/ UNESP- Botucatu, respectivamente, pelo assessoramento estatístico e pelo processamento das análises estatísticas.

Ao Professor Cidnei Raul Soares, pela revisão ortográfica e gramatical desta tese.

Aos "Mestres", que estiveram presentes na minha formação acadêmica e que foram além da simples docência. Aprendi através dos seus exemplos que a Ciência exige paciência, dedicação e ética. Meu agradecimento especial ao Prof. José Hermano Ramalho, por seu exemplo de dedicação à docência; ao Prof. Dr. Francisco Benedito Kuchinski, por ter-me infundido o amor pela Histologia e me oferecido a dádiva da convivência durante anos; ao Prof. Dr. Eduardo Celso Penna Book, por ter me ensinado a ouvir meus pacientes, por ter me dado a chance de pesquisar pela primeira vez e por ter me auxiliado na elaboração do projeto de estudo que resultou em minha dissertação de mestrado; ao Prof. Dr. Sílvio Alves de Aguiar, pela presença em todas as minhas conquistas acadêmicas; ao Prof. Dr. Sílvio

Boraks, pela disposição constante em ajudar e orientar não só na formação acadêmica, mas na vivência clínica; ao Prof. Dr. Ad Peter Slagter, pela orientação na finalização deste trabalho.

Aos Professores dos Departamentos de Anatomia, Histologia e Embriologia e Biologia Celular. Especialmente à Prof.^a Dr.^a Evanisi Teresa Palomari, ao Prof. Dr. Gerson Eduardo Rocha Campos, à Prof.^a Dr.^a Mary Anne Heidi Dolder, Prof.^a Dr.^a Iara Maria Silva De Luca, Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alberto Rincon, Prof.^a Dr.^a Valéria A. Cagnon Quitete e ao Prof. Dr. José Meciano Filho, pelas inúmeras lições durante todo o curso.

Às secretárias da Pós-graduação do Departamento de Biologia Celular e Estrutural Lílíam Alves Senne Panagio e Sílvia Helena Burgui Kalaf, pela atenção e respeito dispensados durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Anatomia-Unicamp Norivaldo Celestino e Marcos Aurélio Ribeiro de Paula, pela assistência em todos os procedimentos laboratoriais.

Às técnicas do laboratório de Microscopia Eletrônica- UNICAMP Adriane Cristina Sarti Sprogis e Antonia Maria Ferreira Lima, pela colaboração técnica prestada.

À Sra Marlene Lima, pelos cuidados dispensados aos animais utilizados neste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia - Ana Floriana Rodrigues, Carlos Roberto Gonçalves, Delta Rodrigues da Silva, Lourdes

Pinheiro, Odete de Camargo Fabiano, Paulo Afonso Bernardes e Paulo Francisco dos Santos, pela atenção e respeito durante todo o período em que estive no departamento.

Aos colegas de curso nos Departamentos de Anatomia, Histologia e Embriologia e Biologia Celular, especialmente aos queridos amigos Alex Kors Vidsiunas, Iara de Cássia Gomes Coelho, Marcelo Rodrigues da Cunha e Silvane Souza Roman, pela amizade sincera e generosidade em dividir comigo os ensinamentos adquiridos.

À amiga irmã Valéria Augusto, pelas inúmeras provas de amizade, pela paciência e pela força nos momentos em que quase desisti. Muito obrigada amiga.

Aos amigos de graduação - Ana Paola Latorre Moreira, Ângela Alves de Aguiar Goto, Camila Junqueira de Oliveira Lima, Cintia Moura de Oliveira, Érico Berbel Bertão, Francisco Rogério Aguiar de Menezes, Herman Emmanuel Machado da Fonseca, Mário Marcos Borges Ferla, Marisa Del Santo Mello, Maximilaino Hespanhol, Nivaldo Pinho Gonçalves e Vera Lúcia Ferreira Campos de Souza - que sempre incentivaram meu desejo de investir na carreira acadêmica e que mesmo longe torceram por esta realização.

Aos amigos que antes, durante e após este curso sempre foram e serão pessoas raras. A eles - Anderson Cobucci Olivé, André Luís Szirbek, Eduardo Aparecido Mendes de Godói, Eduardo Pulter, Fernando Dias Andrade, José Custódio Rosa Filho, Lauro Gomes Júnior, Luiza Bertolucci, Márcio Rogério Barbosa de Menezes, Marco Antonio Novaes Nogueira, Sílvia Inês S. Giaretta, Tejo Damasceno Ferreira, Vivane Prado Fernandes

Caldana de Souza e Yale Oliveira Horta - dedico não só carinho e amizade, mas respeito e admiração; o meu sincero agradecimento por estarem na minha vida de forma especial.

À Capes pelo auxílio financeiro concedido.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para esta minha conquista.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	10
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	14
O alcoolismo	14
A mucosa bucal	16
A reparação	22
Os efeitos do álcool no organismo	28
OBJETIVO	33
MATERIAL E MÉTODO	34
Protocolo animal	34
Procedimentos cirúrgicos	34
Procedimentos para microscopia de luz	36
Procedimentos para microscopia eletrônica de transmissão	36
Procedimentos para microscopia eletrônica de varredura	36
Parâmetros de avaliação das amostras	37
Procedimento para análise quantitativa em microscopia de luz	38
Procedimento para análise quantitativa em microscopia eletrônica de transmissão	39
Procedimentos para análise estatística	39
RESULTADOS	41
Aspectos Macroscópicos	41

Aspectos Microscópicos - Microscopia de Luz	43
Microscopia Eletrônica de Transmissão	58
Microscopia Eletrônica de Varredura	66
Análise estatística	73
DISCUSSÃO	83
CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXO 1	98
ANEXO 2	110

RESUMO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o alcoolismo é hoje um dos principais problemas de saúde pública mundial. É notório que o consumo crônico de álcool pode trazer danos irreversíveis ao organismo, principalmente às mucosas que sofrem sua ação direta, como a bucal e as do trato gastrointestinal. Observações clínicas de pacientes alcoólatras demonstram que eles apresentam atraso no processo de cicatrização e elevado índice de infecções pós-operatórias. Assim sendo, o objetivo do presente trabalho foi estudar o reparo de lesões produzidas cirurgicamente na mucosa bucal da bochecha de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental. Quarenta ratos machos adultos da linhagem Wistar foram divididos em dois grupos. O grupo tratado recebeu dieta sólida, mais solução de etanol a 25%, e o grupo controle recebeu a mesma dieta, porém sem adição de etanol. A dieta foi mantida por 270 dias. As lesões foram feitas na mucosa da bochecha com um instrumento tipo “punch” e não foram suturadas. Cada grupo foi subdividido em 4 subgrupos sacrificados respectivamente com 24, 48, 72 e 240 horas pós-cirúrgicas. Amostras coletadas foram processadas histologicamente e coradas em H/E. Outras amostras foram divididas em duas partes, as quais foram processadas respectivamente para observação em microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. As observações macroscópicas, microscópicas e ultraestruturais demonstraram que, nos animais tratados, o consumo de solução de etanol aumentou os espaços intercelulares das células epiteliais, diminuiu a quantidade e migração de leucócitos, ocasionou atrofia das células basais, assim como aumentou as inclusões lipídicas em seu citoplasma e induziu aumento de descamação celular do epitélio da mucosa em estudo. Com base nesses resultados, pode-se inferir que o consumo crônico de solução de etanol a 25% foi danoso ao processo de reparação de lesões cirúrgicas na mucosa bucal de ratos.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), the alcoholism is today one of the biggest problems of public health in the world. Is notorious that the chronic consumption of alcohol can bring irreversible damages to the organism, specially to the mucous membranes that suffer its direct action, as the buccal and the of digestive system. Clinical commnets of alcoholic patients demonstrate that they present delay in the healing and high index of postoperative infections. The goal of the present work was to evaluate the phases of the healing of surgical lesions in the buccal mucous membrane of rats submitted to the experimental chronic alcoholism. 40 adult male rats of the Wistar ancestry were divided in two groups. The treated group received solid diet plus ethanol solution to 25% and the group control received the same diet plus solution without alcohol. The diet was maintained by 270 days. The metoth was to lesions in the mucous of oral cavity with a punch's tipe dermatological instrument. The lesions were not sutured. Each group was subdivided in 4 sub-groups sacrificed respectively with 24, 48, 72 and 240 after-surgical hours. Fragments collected were processed histological form to Hematoxiline and eosine (H/E), stain. Other fragments were divided in two parts, which had been processed respectively for comment in electronic microscopy of transmission and of Scanning. The macroscopic, microscopic and ultrastructural results demonstrated that in the treated animals, the consupcion of ethanol solution magnified the intercellular spaces of the ephitelial cells, diminished the production and migration of leucocytes, caused atrophy of the basal cells, as well, magnified the lipid droplets into its cytoplasm and induced increase of cellular scalling off in the epithelium stratumof the mucous membrane in study. Based in those results to can affirm that, the chronic consumption of ethanol solution to 25% was harmful to healing of surgical lesions in the buccal mucous membrane of rats.

INTRODUÇÃO

O alcoolismo

O alcoolismo tem se mostrado nas últimas décadas, um dos principais problemas de saúde pública no Brasil e em países do mundo todo, sendo o causador de centenas de milhares de óbitos prematuros, contribuindo em consideráveis gastos nacionais em saúde e sendo responsável pela perda de produtividade na população economicamente ativa. Segundo disponíveis no site da Organização Mundial de Saúde (OMS), seu consumo entre a população jovem (12 a 17 anos) tem crescido assustadoramente (WHO, 2001).

De acordo com um levantamento realizado pelo Grupo Interdisciplinar de Estudos de Álcool e Drogas (GREA) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas, em São Paulo, cerca de 15% da população brasileira é alcoólatra. Dados obtidos em outros países giram em torno de 12% a 13%, segundo o coordenador do grupo, Arthur Guerra de Andrade. No Brasil, 45% dos jovens entre 13 e 19 anos envolvidos em acidentes haviam ingerido bebidas alcoólicas (pesquisa realizada em cinco capitais do país) e 90% das internações em hospitais psiquiátricos por dependência de drogas acontecem devido ao álcool. (GREA, 2001)

Segundo o Prof. Dr. Antony Wong, toxicologista, diretor do centro de assistência toxicológica (CEATOX) do Instituto da Criança do HC da cidade de São Paulo, o problema do alcoolismo no Brasil está associado aos fatores socioeconômicos. Nas empresas, por exemplo, o excesso de álcool associado ao consumo de drogas causa sérias perdas financeiras e de imagem pública. É responsável por uma queda de produtividade equivalente a 500 milhões de dólares por ano, responde por 25% dos acidentes de trabalho e os usuários faltam dez vezes mais do que os não usuários. Dados da Secretaria da Saúde

do Estado de São Paulo revelaram que cerca de 50% das internações em hospitais psiquiátricos estão relacionadas com o uso abusivo de álcool (SCHEINBERG, 2001). Em um estudo recente com dados específicos para a grande São Paulo, Carlini-Cotrin e Chasin (2000), estudaram alcolemia em mortes com causas externas em pessoas com 13 anos ou mais no Instituto Médico Legal (IML) em 1994. Resultados positivos para alcolemia foram encontrados em 53,2% dos pedestres e 50,6% de todas as vítimas de acidentes de carro.

Em 1993, na décima revisão da Classificação Internacional de Doenças feita pela Organização Mundial de Saúde, o alcoolismo crônico foi classificado, entre os transtornos mentais e comportamentais decorrentes do uso de álcool, como sendo um conjunto de fenômenos comportamentais, cognitivos e fisiológicos que se desenvolvem depois de repetido consumo de uma substância psicoativa, tipicamente associado ao desejo poderoso de tomar a droga, à dificuldade de controlar o consumo, à utilização persistente apesar das suas conseqüências nefastas, a uma maior prioridade dada ao uso da droga em detrimento de outras atividades e obrigações, a um aumento da tolerância pela droga e, por vezes, a um estado de abstinência física (CID-10: F10. 2 – WHO, 2001).

O etanol ou álcool etílico é uma molécula pequena, de peso molecular 40, composto por dois átomos de carbono. É considerado um solvente universal, sendo trinta vezes mais solúvel em água do que em lípides, concentrando-se, por esse motivo, em órgãos com maior conteúdo hídrico (LEHNINGER, 1991). O etanol é o principal componente das bebidas alcoólicas, sejam elas destiladas ou fermentadas. A sua absorção ocorre principalmente através das mucosas do trato gastrointestinal, sendo também absorvido no trato respiratório (nos alvéolos) e através da pele, principalmente em crianças. Após a ingestão, a absorção da solução de etanol é rápida no tubo digestório. Cerca de 20%

são absorvidos no estômago e 80% no intestino delgado, principalmente no duodeno. O etanol distribui-se praticamente por todos os líquidos corpóreos, intra e extracelulares (LARANJEIRA, 1996) Após a absorção, cerca de 80 a 90% do etanol sofrem metabolização hepática, 2 a 10% são excretados inalterados, através dos pulmões, rins, suor e saliva, e o restante é metabolizado em outros tecidos dos sistemas nervoso e muscular. A concentração de etanol é baixa nos tecidos ósseo e adiposo (FORTES 1997 e LARANJEIRA, 1996).

A metabolização completa do etanol realiza-se entre oito a dez horas, e a velocidade de sua remoção varia de acordo com fatores étnicos, idade, presença de patologias hepáticas, como esteatose hepática e cirrose e uso de drogas, entre elas o etanol. A degradação do etanol se faz em 2 etapas: a primeira consiste na sua transformação em acetaldeído e realiza-se principalmente no fígado; na etapa seguinte, o acetaldeído é convertido em acetato, e a principal enzima responsável pela sua oxidação é a acetaldeído-desidrogenase, encontrada no citosol e na matriz mitocondrial do hepatócito. (LI, 1983)

A mucosa bucal

A cavidade oral, tanto no homem como no rato, é revestida por uma túnica mucosa que desempenha diversas funções, a maior delas é proteger os tecidos mais profundos da cavidade oral. Entre suas outras funções, encontram-se a de atuar como órgão sensorial e a de servir de local de atividade glandular. Esta túnica mucosa recebe o nome de mucosa bucal. (Fig 1). (TEN CATE, 1994).

Basicamente, tanto no rato como no homem a mucosa bucal é constituída por dois tecidos: o tecido epitelial na superfície e o tecido conjuntivo que, localizado subjacentemente a este, é denominado lâmina própria e confere sustentação e nutrição ao epitélio. O epitélio de revestimento da mucosa bucal é do tipo estratificado pavimentoso. No homem ele é queratinizado em algumas regiões e em outras não, porém no rato ele é queratinizado em toda sua extensão.

Esse epitélio é constituído por várias camadas de células cujas mais profundas que ficam sobre a membrana basal constituem a denominada camada basal. Após a citocinese, por mecanismo ainda não definido, uma célula permanece na camada germinativa e a outra se modifica e migra para o estrato suprajacente que é denominado estrato ou camada espinhosa. Do estrato espinhoso, as células epiteliais, que também são denominadas queratinócitos, continuam se modificando morfológicamente de células poliédricas ricamente unidas entre si por desmossomos proeminentes, passando à forma achatada para constituir a camada superficial nas áreas em que o epitélio não é queratinizado. Nas regiões queratinizadas, as células da camada espinhosa, além de se achatarem, vão sintetizando os denominados grânulos de queratohialina, que nos cortes histológicos corados pela técnica de hematoxilina e eosina comportam-se basofilicamente, corando-se basicamente pela hematoxilina. O estrato constituído por estas células epiteliais ricas em grânulos de queratohialina é chamado de camada granulosa. Na superfície desta, encontra-se então a camada de queratina ou estrato córneo. Essa camada, por sua vez, pode ser constituída por uma estrutura eosinófila e homogênea ao microscópio óptico, que é denominada ortoqueratina, ou então apresentar restos de queratinócitos que sofreram o processo de necrobiose e, nesse caso, ser denominada paraqueratina. (KUCHINSKI, 2000)

O conjuntivo dessa mucosa ou a lâmina própria divide-se em camada papilar e camada reticular. A camada papilar projeta-se superficialmente como se fossem dedos em direção ao epitélio de revestimento, formando as papilas conjuntivas (delomorfias). Estas papilas variam em profundidade e quantidade nas várias regiões da boca, sendo que as áreas de maior solicitação mecânica, como as regiões do palato duro, apresentam maior número de papilas alongadas para oferecerem maior resistência friccional ao epitélio. Na camada papilar as fibras colágenas são delgadas e estão num arranjo frouxo como muitas alças capilares presentes. A camada reticular, em contraste, é constituída por fibras que tendem a orientar num plano paralelo à superfície epitelial. A lâmina própria encerra fibroblastos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, vasos sanguíneos, elementos nervosos e fibras colágenas, elásticas e oxitalânicas embebidas numa substância fundamental amorfa.

Unindo o epitélio de revestimento à lâmina própria, existe uma estrutura formada por colágeno tipo IV e complexa glicoproteica, a qual se denomina membrana basal, que pode ser destacada visualmente em nível da microscopia óptica pela reação do ácido periódico de Schiff ou impregnação argêntica.

Abaixo da lâmina própria existe a submucosa que se interpõe entre a mucosa e os tecidos subjacentes: adiposo, muscular e ósseo.

As glândulas salivares menores, que existem em certas regiões da mucosa bucal, normalmente estão na lâmina própria ou nas proximidades da lâmina própria e submucosa. Muitas vezes, é possível encontrar algumas glândulas sebáceas na lâmina própria, constituindo os chamados grânulos de Fordyce. (KUCHINSKI, 2000)

Há quatro tipos de mucosa revestindo a cavidade oral, são eles:

- **Mucosa de transição:** consiste na região de transição da pele que contém os anexos cutâneos e a mucosa interna do lábio. Nessa

região, as papilas epiteliais são longas e apresentam alças capilares que conferem a coloração avermelhada intensa do local. É uma região desprovida de glândulas salivares, mas pode conter algumas glândulas sebáceas. O epitélio de revestimento nessa região de transição mucocutânea, que é denominada vermelhidão do lábio, é do tipo pavimentoso estratificado queratinizado.

- **Mucosa de revestimento:** reveste o ventre da língua, a face interna dos lábios, as bochechas, o assoalho da boca e o processo alveolar até a gengiva. Geralmente é flexível e apresenta a lâmina própria com tecido conjuntivo frouxo, cujas fibras colágenas e elásticas seguem um trajeto sinuoso. As fibras elásticas ajudam no deslocamento da mucosa de revestimento, principalmente na sua posição de retorno aos tecidos internos, como em direção aos músculos, durante a mastigação. Seu revestimento epitelial é do tipo pavimentoso estratificado não queratinizado, com papilas pequenas e em menor número que na mucosa mastigatória.
- **Mucosa mastigatória:** reveste a mucosa do palato duro e a gengiva inserida, é aquela que recobre as áreas expostas às forças compressivas e de atritos impostas pela mastigação dos alimentos. A lâmina própria dessas regiões é espessa, com densa rede de fibras colágenas na forma de espessos feixes que estão intimamente associados, seguindo um trajeto direto entre seus pontos de ancoragem. O epitélio de revestimento é pavimentoso estratificado ortoqueratinizado ou, às vezes, paraqueratinizado, com papilas

epiteliais alongadas e em maior quantidade por espaço em relação à mucosa de revestimento. A mucosa mastigatória se apóia sobre estruturas ósseas e se liga firmemente ao periósteo.

- **Mucosa especializada:** recobre o dorso da língua e tem função sensorial. É nessa região que se encontram os botões gustativos responsáveis pelo paladar. (GARDNER, 1978)

Além dos queratinócitos, encontram-se na faixa epitelial as células de Langerhans, que são derivadas da medula óssea e atuam como parte do sistema imunológico, realizando o processamento de antígenos, os melanócitos, que são células dendríticas sem desmossomos ou tonofilamentos e fazem a síntese de melanina que é transferida para os queratinócitos vizinhos, e as células de Merkel que são derivadas da crista neural e se localizam no nível da camada basal e apresentam proximidades com fibras nervosas e são responsáveis pela percepção tátil.

As bochechas são as paredes jugais, constituídas pela fusão da comissura que une os processos maxilares e mandibulares. São as porções salientes das faces. A histologia da porção externa é semelhante à histologia da pele fina, e a porção interna é revestida por epitélio pavimentoso estratificado escamoso não queratinizado, com núcleos picnóticos, lâmina própria de conjuntivo frouxo apresentando grande quantidade de fibras elásticas. No rato o epitélio encontrado nessa região é estratificado pavimentoso queratinizado.

A submucosa conecta a lâmina própria à delgada fâscia dos músculos. Sua histologia é conjuntiva, com o tecido adiposo bem desenvolvido. Contém também as porções secretoras das glândulas. As glândulas salivares menores são encontradas entre os feixes do músculo bucinador. As fibras elásticas da lâmina própria evitam o pregueamento

da mucosa e também a interposição das pregas entre as arcadas dentárias durante a mastigação.

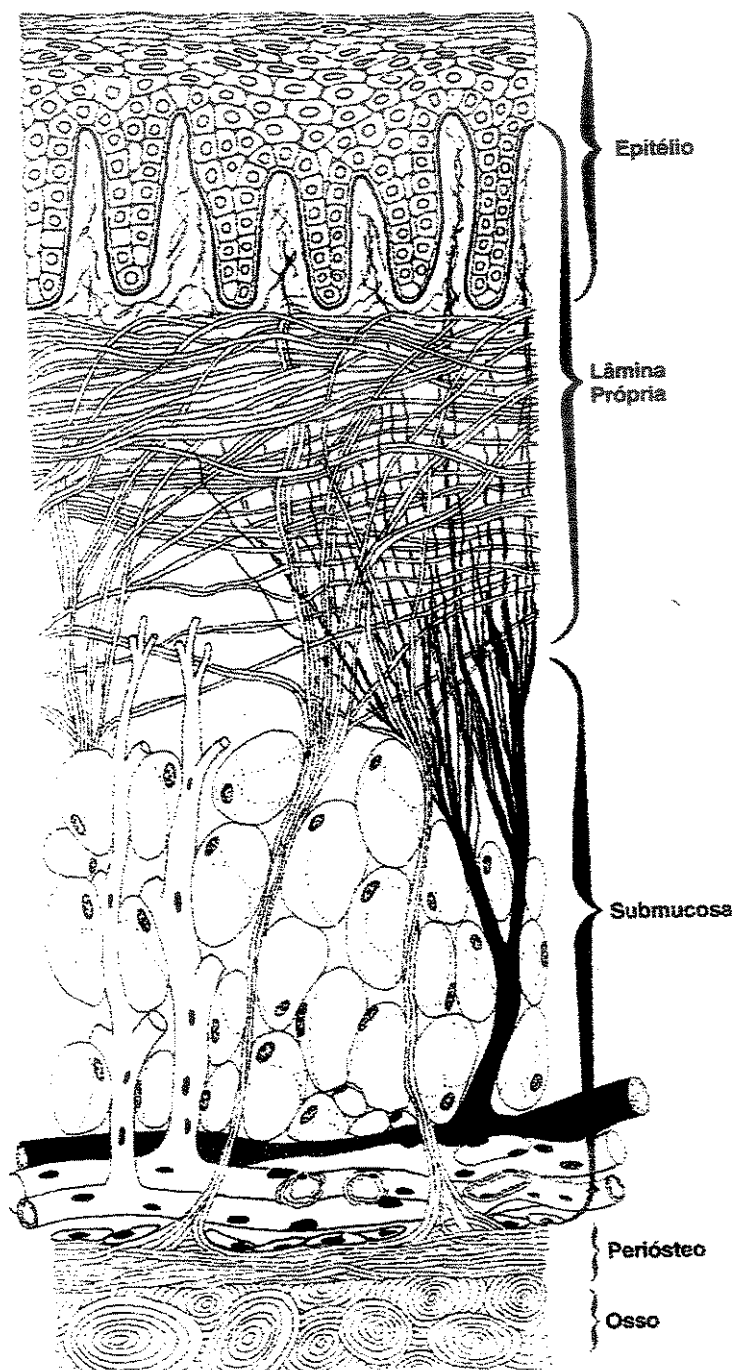


Fig 1- Componentes teciduais da mucosa bucal.*

* Ilustração do livro *Histologia Bucal*, TEN CATE, R A, 1994.

A reparação

Reparação é o processo através do qual os tecidos restabelecem um arranjo morfológico e fisiológico depois de sofrerem uma injúria.

Quando ocorre uma injúria, sangue e plasma extravasam para a área agredida, trazendo células e substâncias químicas que dão origem a uma série de eventos: coagulação, inflamação, mobilização de células, formação de tecido de granulação, reparação e remodelação. A reparação pode ser chamada de regeneração, quando a substituição do tecido lesado é feita a partir de células do mesmo tipo daquelas que se perderam, voltando o tecido à sua estrutura anterior. É chamada cicatrização, quando o reparo se faz à custa da proliferação de tecido conjuntivo fibroso, deixando, no final, uma cicatriz na maioria das vezes. (COTRAN, 1999).

Estudaremos estes eventos relacionados a uma ferida incisional no tecido gengival. A incisão será realizada através do epitélio, matriz do tecido conjuntivo e capilares da região.

Coagulação e inflamação.

As primeiras alterações de uma injúria ocorrem em nível vascular. Observa-se uma vasocostricção transitória que dura alguns segundos e é seguida de uma prolongada vasodilatação aumentando a permeabilidade vascular. Constituintes sangüíneos saem em direção à ferida que tem sua pressão hidrostática aumentada, levando ao acúmulo de fluido (edema). O aumento da pressão extravascular é suficiente para causar o colapso de capilares e veias adjacentes, contribuindo para o controle do sangramento.

O extravasamento sangüíneo permite a saída de células, plaquetas e outros elementos sangüíneos para o local da agressão. As **plaquetas** chegam à ferida como

resultado da hemorragia e são ativadas pela exposição do colágeno dos capilares rompidos (colágeno tipo IV e V são encontrados associados a pequenos vasos sanguíneos). Após serem ativadas, as plaquetas tornam-se achatadas, projetando pseudópodos para auxiliar na agregação com outras plaquetas. As plaquetas modificam sua forma para aumentar a área de contato com as estruturas subendoteliais expostas, liberando então seus grânulos.

A agregação plaquetária e a formação de um tampão ocorrem em 3 minutos após a agressão. O tampão plaquetário auxilia no selamento temporário dos vasos sanguíneos lesionados. A Tromboxana possui ação vasoconstritora e ativa o mecanismo em cascata da coagulação, levando à formação da rede de fibrina que impede a movimentação do tampão plaquetário. É um derivado do ácido araquidônico, especificamente de sua reação de redução que pode ocorrer por duas vias enzimáticas: ciclooxigenase e lipoxigenase.

Fenômenos celulares e inflamação aguda

A diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo faz com que células sanguíneas, principalmente polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) e outros granulócitos como os basófilos e eosinófilos, normalmente encontradas numa posição axial dentro dos vasos, passem a localizar-se próximo à parede endotelial. Este processo é denominado marginação leucocitária. Por diapedese, após a sedimentação nos vasos sanguíneos, por quimiotaxia, os granulócitos dirigem-se ao local da injúria.

Nas primeiras 24 horas após a injúria, ocorre um rápido acúmulo de PMNs, o que constitui um sinal histológico de inflamação aguda. Sua função é a fagocitose e digestão de material estranho e restos celulares.

Os sinais clínicos da inflamação aguda são: **dor, calor, rubor tumor e perda da função**. Estes sinais indicam um aumento do fluxo sanguíneo na área (calor e rubor), liberação de mediadores como as cininas (dor) e acúmulo de fluido, resultando em edema (tumor e perda da função). (KUCHINSKI, 2000)

Os **PMNs** constituem a primeira linha de defesa e são as primeiras células fagocitárias a chegarem no local. Seus números atingem o máximo durante o 1º dia e começam a diminuir no 3º dia após a agressão, em parte, porque seu tempo de vida é de dois dias. Os **basófilos** encontrados nos vasos sanguíneos podem migrar para os tecidos e funcionar como um mastócito. Os basófilos têm longa duração e podem se multiplicar nos tecidos. Também os linfócitos e plasmócitos podem ser ativados e migrarem para o local da injúria.

Reparação

Uma vez atingindo o pico do processo inflamatório agudo, outras atividades começam a modificar o ambiente levando à reparação. Em nível celular, há uma diminuição dos mediadores da inflamação associado ao aumento dos fatores de crescimento.

Durante as 12 horas iniciais após a agressão, as células epiteliais nas margens da lesão sofrem um processo de “desdiferenciação”, tornando-se mais primitivas. Isso resulta em modificações celulares: as células adquirem capacidade de realizar movimentos amebóides, sofrem redução das organelas, suas membranas apresentam-se enrugadas, possuem menos desmossomos, têm altas taxas metabólicas, sua superfície libera receptores que interagem com componentes da lesão e tornam-se células fagocitárias.

As células epiteliais modificadas aumentam o número de fendas de junção, melhorando a união entre as células. Utilizando o coágulo como superfície de apoio, realizam movimentos amebóides em direção aos fragmentos e a fibrina, que são fagocitados no caminho (com a ajuda da collagenase e do fator ativador do plasminogênio). Realizam seu trajeto organizadas em fileiras de uma ou duas células localizadas entre o coágulo e a base da lesão. Ao se movimentarem, as células epiteliais têm de formar a **lâmina basal** que foi perdida. Elas produzem fibronectina, colágeno tipo IV e V e dispõem-se laminarmente para formar uma membrana basal imatura.

Enquanto as células epiteliais nas margens da lesão movimentam-se, a célula mais próxima se divide para preencher o espaço vazio. Isto se repete até que a lesão seja recoberta. No entanto, outras evidências sugerem que, à medida que as células epiteliais marginais se movem, as células imediatamente abaixo assumem a posição dianteira, substituindo-as. A movimentação das células epiteliais cessa quando o contato celular é restabelecido. A partir desse momento, as células epiteliais tornam-se mais diferenciadas e começam a multiplicar-se, eventualmente retornando ao seu arranjo estratificado original. O rearranjo interno das células ocorre novamente para haver produção de queratina como atividade principal dessas células.

No centro do processo de reparação estão os macrófagos, que têm a capacidade de realizar várias funções. A “batalha” mediada pelos macrófagos inclui o desbridamento do local de reparação; liberação de mediadores do processo inflamatório e enzimas; liberação de mediadores da reabsorção óssea; liberação de fatores angiogênicos (AF) e liberação de fatores que promovem a proliferação de células endoteliais e fibroblastos.

A função do macrófago é mediada por fatores no interior do microambiente da lesão. O macrófago induz a formação de novos vasos sanguíneos através da liberação de AF e quimioatrativos para o endotélio.

Os fibroblastos próximos à lesão começam a proliferar rapidamente, migrando para o seu interior e alcançado seu maior número no 6º dia. O papel dos fibroblastos é a produção de substâncias que irão constituir o novo tecido conjuntivo, participação na contração da ferida e remodelação do tecido lesado.

O tecido de granulação

Em respostas aos estímulos dos mediadores, os capilares do tecido conjuntivo adjacente desenvolvem estruturas como brotos que se ramificam e formam enovelados que penetram no tecido lesado num processo denominado **angiogênese**.

Para que ocorra a angiogênese, é necessária uma degradação enzimática da membrana basal de um vaso preexistente, migração das células endoteliais e, por fim, maturação e organização em tubos capilares.

A heparina liberada pelos basófilos e mastócitos estimula a migração do endotélio capilar no coágulo. A heparina também estimula alguns dos fatores de crescimento necessários para a formação de novos vasos.

Quando as ramificações dos capilares se encontram, formam um tecido rico em vasos sanguíneos, fibroblastos em seus produtos. Este tecido que substitui gradualmente o coágulo é denominado tecido de granulação.

O tecido de granulação é rico em colágeno e fibronectinas. Estas têm função de organização do tecido e síntese da matriz de tecido conjuntivo.

Os fibroblastos do tecido de granulação produzem a maioria dos constituintes da matriz extracelular

O colágeno forma as fibras que conferem ao tecido sua força de tensão e constitui 60% do total do tecido gengival. No tecido de granulação, predomina inicialmente o colágeno tipo III. À medida que o tecido amadurece, estas fibras diminuem gradualmente até chegarem aproximadamente a 20% do colágeno total.

A força de tensão da ferida aumenta à medida que a quantidade do colágeno tipo I aumenta. Durante o processo de reparação, o colágeno é formado, destruído e novamente formado.

A maturação da ferida

À medida que a reparação progride, a vascularização diminui, pois o tecido de granulação é substituído por tecido conjuntivo jovem neoformado. Logo no início do processo de maturação, principia-se a contração do tecido conjuntivo. A contração envolve a movimentação, nas bordas da ferida, de tecido conjuntivo e epitelial como um todo (GABBIANI, 1971 e KUCHINSKI, 2000).

Na ferida, são encontrados **miofibroblastos** cujas propriedades são semelhantes às das células da musculatura lisa. Os miofibroblastos são decisivos no processo de contração da ferida.(RYAN, 1997). Nas feridas com bordas afastadas e grandes volumes de tecidos perdidos, a contração é maior. Quando as bordas da ferida estão em contato, a contração é menor. O resultado da contração é uma área cicatricial bem menor que o tamanho da ferida. Histologicamente, a cicatriz representa uma área que possui proporcionalmente maior quantidade de fibras colágenas do que células.

A largura do coágulo formado entre as bordas da lesão, determina se a cicatrização vai ocorrer por primeira intenção (coágulo estreito) ou por segunda intenção (defeito mais largo).

O tecido gengival cicatriza praticamente sem formação de cicatriz, enquanto a mucosa alveolar forma tecido cicatricial em seu processo de reparação. Na mucosa alveolar ocorre também uma contração da ferida, que não é observada na gengiva inserida, fato que não está totalmente esclarecido.

A remodelação é um processo que resulta no rearranjo das fibras colágenas e proteoglicans. Pode-se observar um certo nível de remodelação contínua que ocorre no sentido de manutenção do tecido normal. A remodelação é o resultado da destruição do colágeno que foi depositado em excesso.

O reparo da mucosa bucal pode ser influenciado por fatores locais, como higiene oral, presença de infecções locais, estado geral do indivíduo e uso de drogas. (BOZZO, 1996) Estes fatores podem reduzir, retardar ou impedir o processo. Por exemplo, a presença de corpos estranhos pode retardar o processo de reparação, porque mantém a reação inflamatória local devido à ação mecânica irritante.

Os efeitos do álcool no organismo

Vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de observar os efeitos do consumo de álcool em vários tecidos, tais como intestino delgado (ZUCOLOTO, 1979), próstata e vesícula seminal (MARTINEZ, 1993; CAGNON, 1996, COELHO, 2000), estômago (AL-DAMOUK, 1993), sobre a ação do etanol sobre o sistema nervoso central e periférico. (KALANT, 1975) e sobre a mucosa bucal (MARTINEZ, 1998).

Sabe-se que o álcool possui duas vias de ação sobre o organismo – uma direta, causada pelo íntimo contato da droga com as mucosas, e outra indireta, efeito da droga absorvida pelo organismo que após encontrar-se na corrente sanguínea atinge a intimidade de todos os tecidos do organismo (LIEBER, 1994 e LIEBER, 1999). A gravidade dos danos causados aos tecidos está diretamente relacionada à concentração do álcool (MÜLLER, 1983).

Os efeitos do álcool no tubo digestório são mais evidentes, talvez por ser o primeiro segmento corpóreo a receber elevadas concentrações do etanol. Diversos sintomas e algumas doenças bem estabelecidas têm relação com a ingestão alcoólica: esofagite, alterações funcionais e inflamatórias do estômago e enterocolopatias.

O álcool possui ação deletéria à integridade da mucosa da laringe, podendo ser demonstrada pelo aumento da renovação celular e alteração na morfologia celular após a ingestão do etanol (FRANCESCHI, 2000, FRANCESCHI, 1999, MAIER, 1999; KELLER, 1965). De conhecimento geral é a associação do alcoolismo com a neoplasia maligna do esôfago, principalmente entre aqueles indivíduos que ingerem vinho e cerveja. (SIMANOWSKI, 1993) Existe a possibilidade de frequência 18 vezes maior de câncer de esôfago no alcoólatra, frequência esta que se eleva para 44 vezes maior quando o álcool está associado ao tabagismo (SCHLECHT, 1999).

Como foi demonstrado em ratos, o álcool é capaz de agredir a mucosa do estômago e determinar diminuição da produção de muco, da resistência da mucosa e da diferença de potencial. Observa-se também a inibição do transporte ativo dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- , perda de proteínas e aumento da permeabilidade e da resistência elétrica da mucosa por ação do etanol. (SEGAWA, 1998) O efeito crônico do álcool sobre o estômago

determina lesões semelhantes à gastrite crônica e atrófica no homem. Os indivíduos alcoólatras mostram com maior frequência metaplasia intestinal e evolução precoce de gastrite superficial para atrófica.(SEGAWA, 1998). Após analisar a ingestão crônica de álcool em ratos, ZUCOLOTO (1979) constatou o encurtamento das vilosidades intestinais, diminuição do número de células epiteliais que recobrem estas vilosidades, bem como e diminuição da altura dos enterócitos e aumento da atividade mitótica das células das criptas.

O álcool etílico pode atuar diretamente sobre vários pontos do sistema imunitário, diminuindo a resposta imune do indivíduo sob seu efeito. A atividade de polimorfonucleares neutrófilos e de macrófagos está diminuída. O álcool etílico leva a uma deficiência de fatores quimiotáticos de neutrófilos e diminuição da atividade dos macrófagos aumentando dessa forma o risco de proliferação de focos infecciosos no organismo (FORTES 1997).

Há evidências de que indivíduos alcoólatras e animais expostos à administração de álcool associado ao uso de nicotina, exibam diminuição da secreção de saliva, desenvolvimento de inflamação crônica na mucosa bucal e aumento da incidência de leucoplasias (BOFETTA, 1992; JABER, 1999; MACLUSKEY, 1999).

MASCRÈS (1981) realizou estudos histoquímicos e ultraestruturais da mucosa bucal de ratos após a administração crônica de álcool durante 98, 200 e 290 dias. Foram observados em todos os grupos experimentais, mas em dimensões diferentes, o espessamento do epitélio, figuras com aspecto de mielina (ERICSSON, 1973) e atividade do DNA aumentada, abordada por metil-pirona. Estas modificações sugeriram que o álcool é capaz de alterar as células, ou seja, torna-as mais frágeis.

MAIER (1994) afirmou que o alcoolismo crônico causa atrofia das glândulas salivares associada à deposição intra e extracelular de lipídeos. Esta atrofia leva à diminuição da produção de saliva, expondo, dessa forma, a mucosa bucal à maior concentração de agentes carcinogênicos.

MASCRÈS (1984) analisou alterações morfológicas na mucosa bucal e esofágica de ratos após a ingestão crônica de álcool. A atrofia epitelial constatada não ocorreu por redução do número de camadas de células, mas pela diminuição do volume das células basais. Sinais discretos de displasia epitelial na mucosa esofágica, pleomorfismo celular incluindo aumento e diminuição do tamanho das células basais foram encontrados após um período longo de consumo de álcool (200 a 290 dias). Estas alterações assemelham-se às encontradas na síndrome de "Plummer-Vinson", um estado pré-cancerígeno no homem.

Os efeitos do etanol nos receptores do fator epidérmico de crescimento da mucosa bucal de ratos (sprague-dawley) foram analisados por WANG (1991). Os resultados sugeriram que as alterações relacionadas com a solução de etanol nos receptores do fator epidérmico de crescimento das células bucais podem interferir com o processo de renovação epitelial, diminuindo a capacidade de defesa dos tecidos moles orais e causar o início de displasias.

Observações clínicas em pacientes alcoólatras, nos hospitais e consultórios odontológicos, demonstraram complicações no processo de cicatrização da mucosa bucal, além de maiores índices de infecções pós-operatórias (HARRIS, 1997; BARTOLD, 1999). Sendo assim, torna-se relevante avaliar os efeitos da solução de etanol sobre a mucosa

bucal, nas várias fases envolvidas no processo de reparação tecidual de lesões cirúrgicas dessa região.

OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a reparação tecidual de lesões confeccionadas cirurgicamente na mucosa bucal de ratos submetidos ao alcoolismo crônico experimental por ingestão de solução de etanol a 25%.

MATERIAL E MÉTODO

Protocolo animal

Foram utilizados 40 ratos albinos (*Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar), machos adultos, com peso inicial aproximado de 150g, provenientes do CEMIB – UNICAMP. Os animais foram divididos em 2 grupos com 20 animais cada. Um grupo recebeu dieta sem adição de etanol e foi chamado de grupo controle. Outro grupo recebeu dieta com solução de etanol a partir do 70º dia de vida e foi chamado de grupo tratado. O etanol foi diluído na água numa concentração inicial de 5% (*Gay Lussac* 5° = 5% V/v), com aumento gradativo (semanal) de 10% até atingir-se a concentração final de 25%V/v. A dieta alcoólica foi mantida por 270 dias. Os animais foram então submetidos ao procedimento cirúrgico e cada grupo de animais foi então dividido em quatro subgrupos que foram sacrificados respectivamente em tempos de 24, 48, 72 e 240 horas após a confecção das lesões cirúrgicas.

O modelo de alcoolismo utilizado foi o semivoluntário, onde o etanol foi adicionando na água, sendo essa mistura (etanol + água) o único líquido oferecido aos animais. A alimentação dos grupos foi à base de ração sólida (Nuvilab CR1) e água (*ad libidum*), trocadas semanalmente. Os ratos foram pesados quinzenalmente, e os volumes de água e ração consumidos pelos animais foram verificados semanalmente.

Procedimentos cirúrgicos

Os animais foram previamente anestesiados com solução 1:1 de cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) e Ketamina (Francotar), via intramuscular, na dose de 1,5ml/kg de peso corporal. Após a anestesia, os animais foram colocados em placa de contenção, em

posição de decúbito dorsal. A boca foi mantida aberta com o auxílio de afastadores. As lesões cirúrgicas foram feitas na mucosa da bochecha de ambos os lados da cavidade oral dos animais, totalizando duas lesões por animal. O instrumento utilizado para fazer as lesões cirúrgicas foi o "punch" para biópsia dermatológica, com 2mm de diâmetro. As lesões cirúrgicas foram confeccionadas com a colocação do instrumento de corte no local previamente selecionado, pressionado contra o tecido, girado em 360°, e após o corte, o instrumento foi puxado e a amostra de tecido cortada com tesoura na sua base inferior. As bordas da ferida não foram suturadas.

Após a confecção das lesões cirúrgicas, o grupo de ratos tratados continuou a receber dieta de ração e água, porém sem adição do etanol, a fim de evitar situação de desconforto para os animais.

Para a coleta das amostras a serem estudadas, os animais foram novamente anestesiados com solução 1:1 de cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%) e Ketamina (Francotar), via intramuscular, na dose de 1,5ml/kg de peso corporal. Após aprofundamento da anestesia, os animais sofreram abertura abdominal sobre a linha alba e foram sacrificados através de pneumotorax, com dilaceração do músculo diafragma, seguida de perfusão intracardiaca. Os animais foram perfundidos previamente com solução de salina tamponada e heparinizada e depois com solução karnovisky 2%, num volume total de 500ml durante 2 horas.

O protocolo experimental utilizado neste trabalho está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Animal (CEEAA) IB-UNICAMP, com os protocolos n.º 108-1 e 108-2 (Vide Anexo 2).

Procedimentos para microscopia de luz

As amostras da mucosa da bochecha direita, após sua remoção, foram fixadas em Formol a 10%, com tampão de cloreto de sódio por 24 horas, incluídos em parafina líquida a 60°, para confecção de blocos para microtomia. Para cada animal foram confeccionadas 2 lâminas contendo 10 cortes semi-seriados, de 5µm cada, corados em soluções de hematoxilina e eosina (H/E), totalizando, dessa forma, 20 cortes por animal.

Procedimentos para microscopia eletrônica de transmissão

As amostras da mucosa da bochecha esquerda, após sua remoção, foram fixadas em Glutaraldeído 2,5%, com tampão fosfato por 24 horas, pós-fixadas com Tetróxido de Ósmio a 1% por duas horas e incluídos em resina plástica (Araldite). Após a confecção dos blocos, o material foi trimado, então cortes semifinos (0,5µm) foram feitos e corados com Azul de Toluidina, para pré-seleção da área de corte. Após a confecção dos cortes ultrafinos (0,1µm) os mesmos foram montados em telas de cobre de 200 Mesh e contrastados com Acetato de Uranila (WATSON, 1958) e Citrato de Chumbo (REYNOLDS, 1963). O material foi observado e fotografado em microscópio eletrônico de transmissão LEO 906, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia - Unicamp.

Procedimentos para microscopia eletrônica de varredura

As amostras de tecido foram fixadas em Karnovsky 2,5%, com tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,2 por 24 horas e pós-fixados com Tetróxido de Ósmio por 1 hora. Após fixação, as amostras foram novamente reduzidas, desidratadas em graduações crescentes de acetona, secas ao ponto crítico e cobertas com ouro. Para cada animal foi

selecionada aleatoriamente 1 amostra, totalizando 20 amostras por grupo. Tal número de amostras está dentro dos padrões estatísticos preestabelecidos para 5% de significância. Nas análises em microscopia de varredura, foi considerado apenas o grupo como um todo, sem as subdivisões em tempos cirúrgicos.

As amostras foram observadas e fotografadas no microscópio eletrônico de varredura MEV JMS-5800LV-JEOL, pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia – Unicamp. Os negativos foram revelados e ampliados no mesmo laboratório.

Parâmetros de avaliação das amostras

As avaliações microscópicas e morfométricas do processo de reparação tecidual foram feitas levando-se em consideração os seguintes parâmetros:

Microscopia de Luz

- 1- Número de camadas celulares do epitélio.
- 2- Número total de células do infiltrado inflamatório por campo observado.
- 3- Número de neutrófilos e sua respectiva porcentagem por campo observado.
- 4- Número de linfócitos e sua respectiva porcentagem por campo observado.
- 5- Número de mastócitos e sua respectiva porcentagem por campo observado.

- 6- Número de outras células não inflamatórias (fibroblastos, fibrócitos, macrófagos, células endoteliais e células mesenquimais) e sua respectiva porcentagem por campo observado.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

- 1- Frações de volume nuclear da célula basal.
- 2- Frações de volume citoplasmático da célula basal.
- 3- Frações de volume total da célula basal.
- 4- Presença ou ausência de vacúolos digestivos nas células epiteliais.
- 5- Presença ou ausência de gotas lipídicas intracelulares nas células epiteliais.

Microscopia Eletrônica de Varredura

- 1- Organização celular do tecido epitelial nas regiões peri lesão
- 2- Presença de alterações morfológicas epiteliais nas regiões peri lesão.

Procedimento para análise quantitativa em microscopia de luz

De acordo com orientação estatística para 5% de significância, foram selecionados aleatoriamente 4 cortes de cada animal, totalizando 20 cortes por subgrupo experimental. Os cortes foram observados sempre da direita para a esquerda e de cima para baixo.

Os números de camadas epiteliais, assim como os números total e parcial de células do infiltrado inflamatório, foram obtidos com o auxílio de uma ocular 10X graduada

com 100 pontos, fixando-se as observações com a objetiva de 100X. A medição se deu contando o número de células ou camadas epiteliais por campo observado em cada corte (MANDARIM-DE-LACERDA, 1999).

Procedimento para análise quantitativa em microscopia eletrônica de transmissão

A quantificação das densidades de área ou frações de volume do núcleo, citoplasma e total celular das células basais epiteliais foi realizada utilizando-se 4 eletromicrografias de cada animal, nos respectivos subgrupos, nos quatro tempos experimentais. O aumento foi fixado em 2784X e a ampliação das eletromicrografias em 2 vezes. Foi aplicada sobre cada eletromicrografia uma folha de acetato, com o sistema-teste Weibel composto por 42 segmentos de retas paralelas com 1,7cm de comprimento. Para quantificar as frações de volume ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) foi utilizada a estereologia. Os cálculos foram realizados a partir do número total de pontos sobre a micrografia (n) do número total de pontos sobre cada estrutura, no caso, o citoplasma (n') e o núcleo (l) (MANDARIM-DE-LACERDA, 1995).

Procedimentos para análise estatística

Para o estudo da variável peso corpóreo (g), foram construídos os limites do intervalo de tempo com 95% de confiança para a resposta média. Considerou-se significativa a não-equivalência dos limites inferiores e superiores entre os grupos, fixado o tempo (NORMAN, 1994).

As variáveis consumo diário de ração por animal(g), consumo diário de líquido por animal (ml), Kcal totais ingeridas diariamente por animal (kcal), kcal vindas da

ração ingeridas diariamente por animal (kcal), tiveram seu estudo realizado com base em análise simples com gráficos de linhas.

O estudo das variáveis número de camadas epiteliais, número de células totais no infiltrado inflamatório, número de neutrófilos no infiltrado inflamatório, número de linfócitos no infiltrado inflamatório, número de mastócitos no infiltrado inflamatório, número de outras células do infiltrado inflamatório, porcentagem de neutrófilos no infiltrado inflamatório, porcentagem de linfócitos no infiltrado inflamatório, porcentagem de mastócitos no infiltrado inflamatório e porcentagem de outras células no infiltrado inflamatório, segundo grupo e momento de sacrifício, foi realizado utilizando-se a técnica de análise de variância não-paramétrica para modelo com dois fatores, sendo o primeiro fator o grupo e segundo fator o momento de sacrifício (NORMAN, 1994), complementada com os testes de comparações múltiplas.

Para indicação da significância dos resultados obtidos nos testes, foram utilizadas letras minúsculas na comparação dos grupos, fixado o momento de sacrifício e letras maiúsculas para momento de sacrifício dentro do grupo. A interpretação das letras foi feita da seguinte maneira:

1. Duas medianas seguidas de uma mesma letra minúscula não diferem quanto às respostas dos grupos dentro do momento de sacrifício.
2. Duas medianas seguidas de uma mesma letra maiúscula não diferem das respostas do momento de sacrifício dentro do grupo.

Todas as conclusões dos testes aplicados foram discutidas com nível de 5% de significância.

RESULTADOS

Aspectos Macroscópicos

24 horas pós-cirúrgicas

Nos animais do grupo controle, a mucosa próxima à lesão estava edemaciada, avermelhada, e a lesão cirúrgica tinha aspecto sanguinolento, caracterizado por ulceração moderada, com exposição do tecido conjuntivo em estado necrótico, em quatro dos cinco animais observados. Em um animal observado, a lesão cirúrgica tinha pontos hemorrágicos e presença do coágulo sangüíneo. No grupo tratado, os cinco animais apresentaram as feridas com aspecto ulcerado e exposição de tecido conjuntivo. Em nenhum animal tratado foram encontrados pontos hemorrágicos na região da lesão.

48 horas pós-cirúrgicas

No grupo controle, em três animais a mucosa estava menos edemaciada, com retração das bordas da ferida, e nos outros dois animais permaneceu o aspecto sanguinolento da lesão cirúrgica, com ligeira retração das bordas da ferida. Nos cinco animais do grupo tratado, a região da ferida estava bastante edemaciada, tinha ainda aspecto sanguinolento e sem retração das suas bordas.

72 horas pós-cirúrgicas

Nos cinco animais do grupo controle, a lesão cirúrgica estava contraída e com coloração esbranquiçada. Em dois animais do grupo foi notada a presença de edema nas bordas da ferida. No grupo tratado, todos os animais tinham as bordas da ferida bastante edemaciadas. Apesar da retração, a lesão cirúrgica estava bem visível.

240 horas pós-cirúrgicas

Em ambos os grupos, tratado e controle, as observações macroscópicas revelaram reparação completa da lesão cirúrgica em todos os animais. A mucosa estava hígida, com textura e coloração normais, sem ulcerações, fissuras ou escamações.

Aspectos Microscópicos - Microscopia de Luz

24 horas pós-cirúrgicas

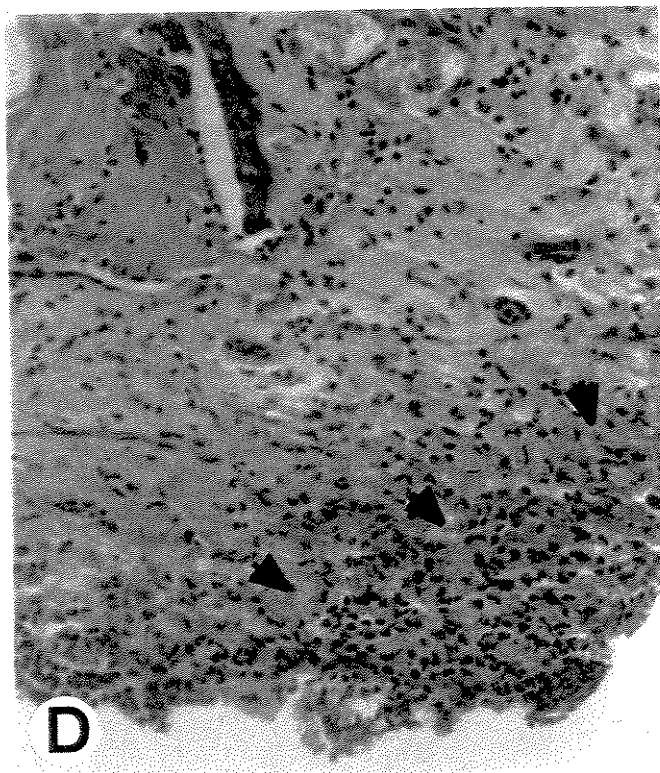
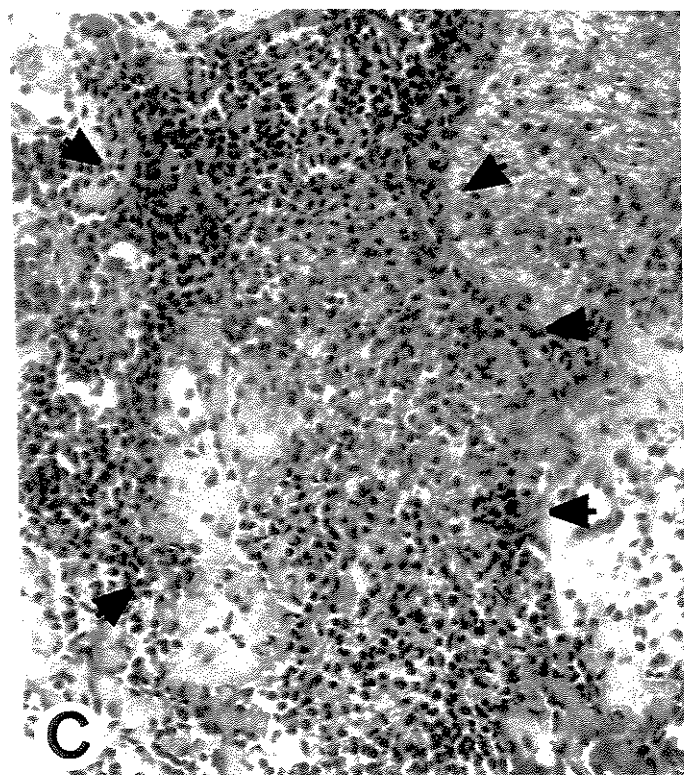
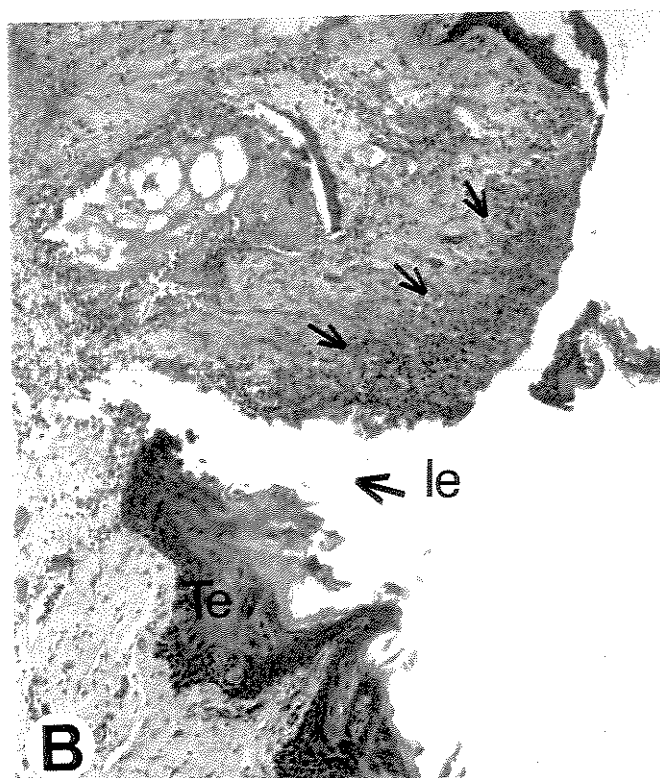
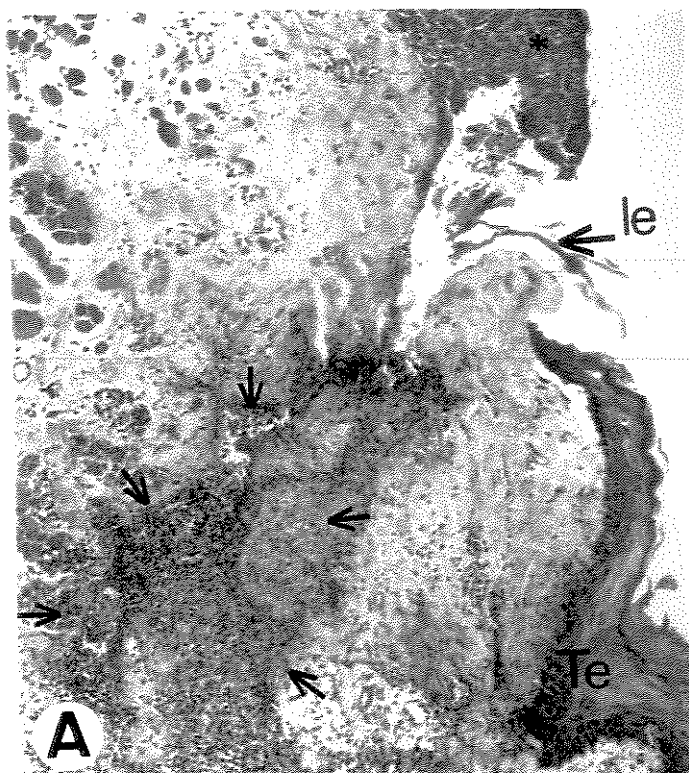
Em todos os cortes a lesão cirúrgica pôde ser observada. Em um dos animais do grupo controle, restos de coágulo sangüíneo permaneceram sobre a ferida (Fig.2A). Nos animais do grupo controle, as amostras apresentaram tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado, composto por 9 a 15 camadas celulares. As células basais eram alongadas, com núcleos seguindo o formato celular. Nos animais do grupo tratado, foi observada diminuição do número de camadas celulares, que variou entre 6 e 12 camadas. Esta diminuição do número de camadas aparentemente resultou na diminuição da espessura do epitélio. Neste grupo, as células basais eram arredondadas ou tinham aspecto poliédrico, com núcleo irregular (Fig.2B).

O infiltrado inflamatório encontrado nos cinco animais do grupo controle, geralmente localizado no tecido conjuntivo da mucosa, próximo à lesão cirúrgica, apresentava inúmeras células de defesa migrando centríptamente dos tecidos vizinhos em grande quantidade. Foram encontrados inúmeros granulócitos em toda mucosa e região de submucosa (muscular). Foi notado, ainda, edema tecidual caracterizado por congestão vascular e dissociação das fibras colágenas em todo tecido circunvizinho à lesão. Os poucos eritrócitos observados encontravam-se nos espaços extravasculares, junto à matriz extracelular e às fibras colágenas (Fig. 2A e 2C). Provavelmente, devido à perfusão com salina tamponada e heparina, para preservação do tecido coletado para análise em microscopia eletrônica. As figuras 3A e 3C permitem melhor visualização das células que compõem o infiltrado inflamatório em maiores aumentos.

Nos animais do grupo tratado, foi encontrado tecido inflamatório pouco desenvolvido, com poucas células de defesa, geralmente concentradas nas margens da lesão e na superfície do coágulo sanguíneo (Fig.2B e2D). Foi observado edema tecidual em todos os animais do grupo. Ocorreu hipocromia das amostras coradas por H/E em relação aos animais controle.

Figura 2

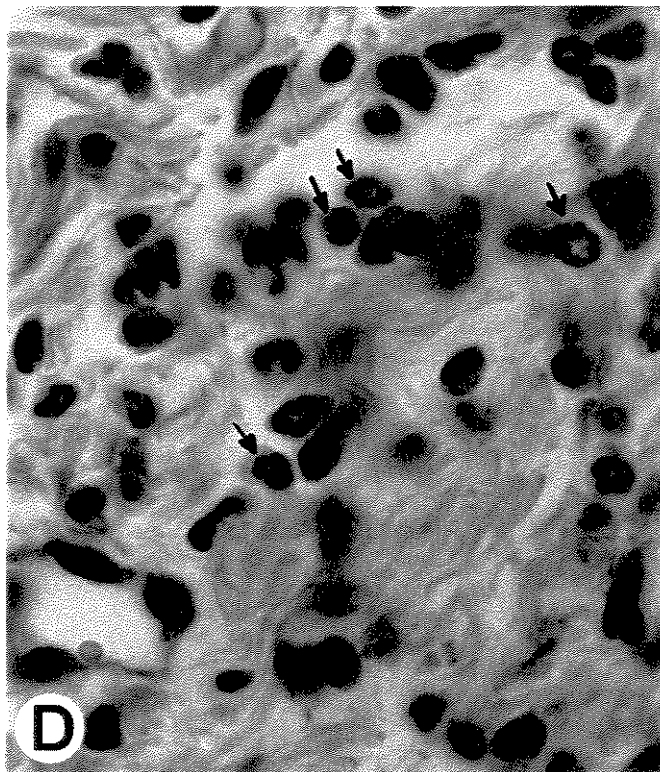
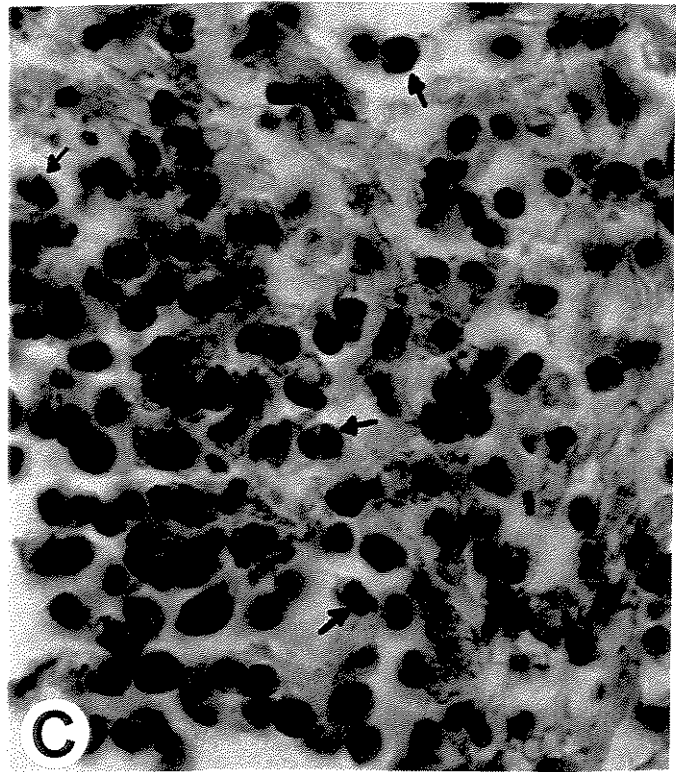
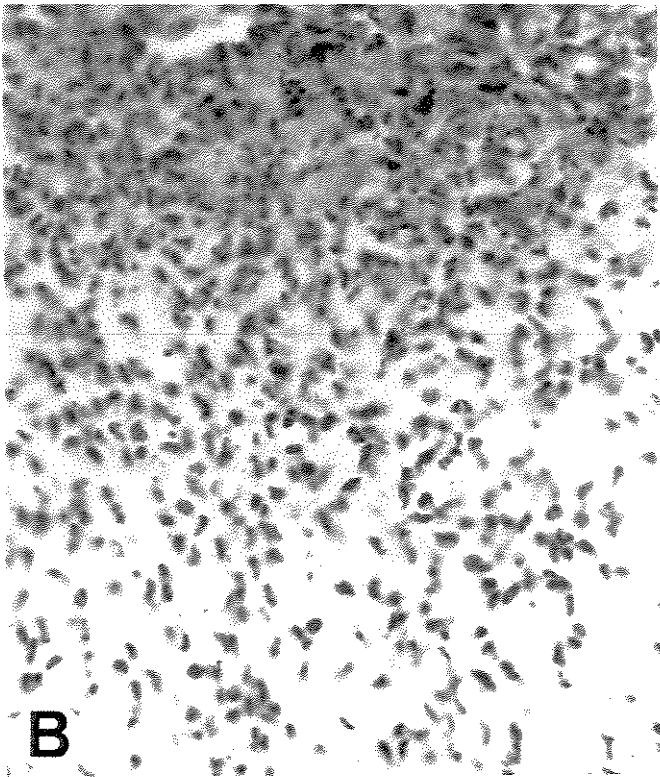
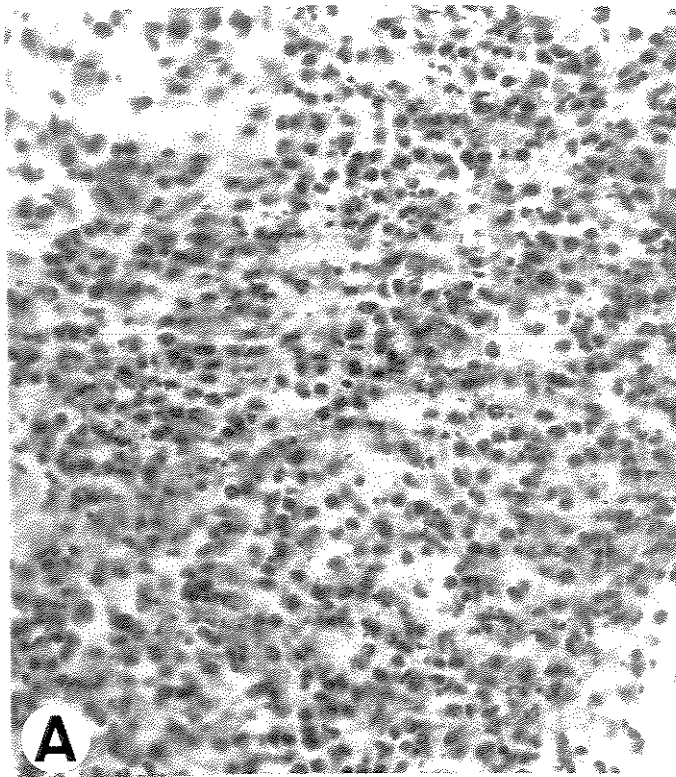
- **A-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha da bochecha em corte transversal de animal do grupo controle, 24 horas após o procedimento cirúrgico. Formação de infiltrado inflamatório (setas) abaixo da lesão cirúrgica (le). Tecido epitelial (Te) remanescente. Notar presença do coágulo sanguíneo sobre a ferida cirúrgica (asterisco). Técnica: H/E. Aumento: 90X.
- **B-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha da bochecha em corte transversal de animal tratado, 24 horas após o procedimento cirúrgico. Formação de infiltrado inflamatório, com muitos granulócitos dispersos na matriz extracelular edemaciada. Notar concentração do infiltrado na superfície da ferida (setas), Tecido epitelial (Te). Técnica: H/E. Aumento: 90X.
- **C-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo controle, 24 horas após o procedimento cirúrgico. Infiltrado inflamatório (setas). Técnica: H/E. Aumento: 290X.
- **D-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal tratado, 24 horas após o procedimento cirúrgico. Formação de infiltrado inflamatório (setas). Técnica: H/E. Aumento: 290X.



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Figura 3

- **A** - Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo controle, 24 horas após o procedimento cirúrgico. Células do infiltrado inflamatório. Técnica: H/E. Aumento: 356X.
- **B** - Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo tratado, 24 horas após o procedimento cirúrgico. Células do infiltrado inflamatório. Técnica: H/E. Aumento: 356X.
- **C** - Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo controle, 24 horas após o procedimento cirúrgico. Células do infiltrado inflamatório. Técnica: H/E. Aumento: 580X.
- **D** - Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo tratado, 24 horas após o procedimento cirúrgico. Células do infiltrado inflamatório. Técnica: H/E. Aumento: 580X.



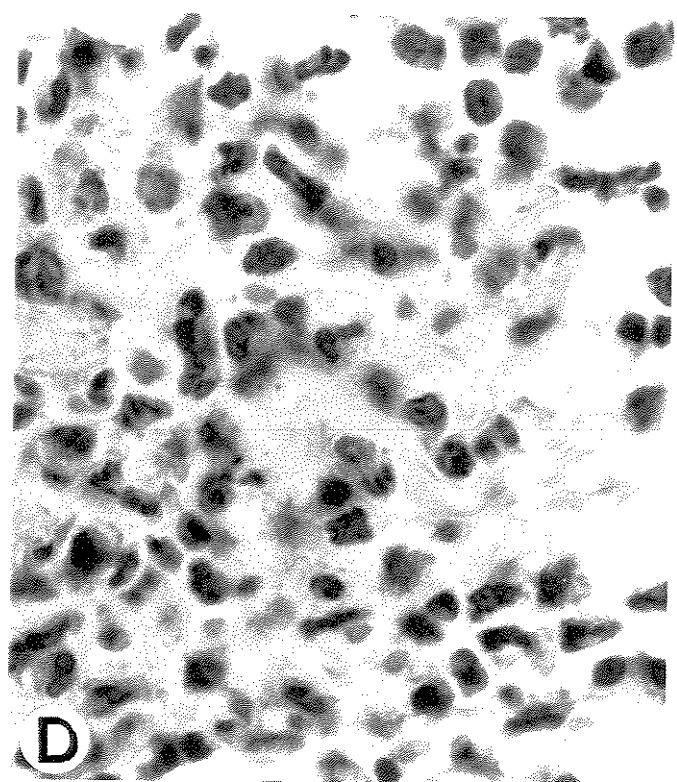
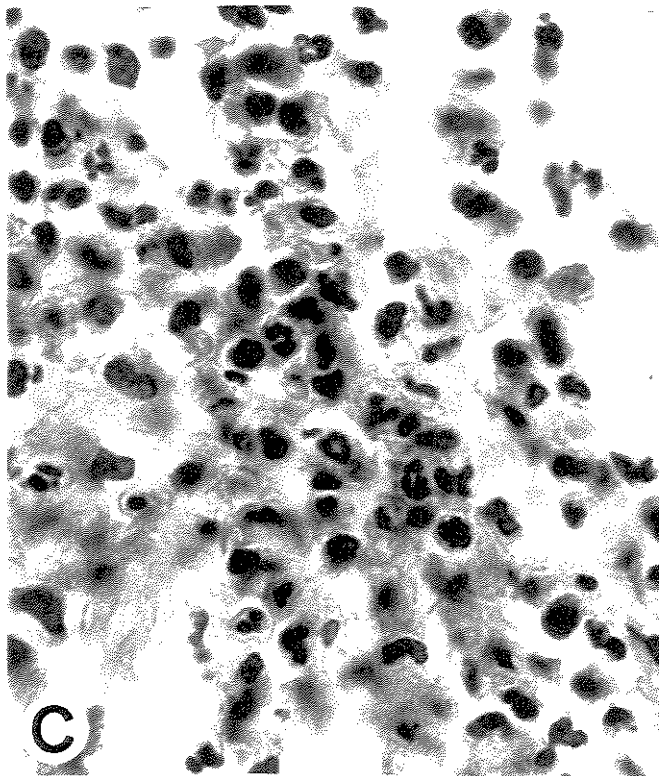
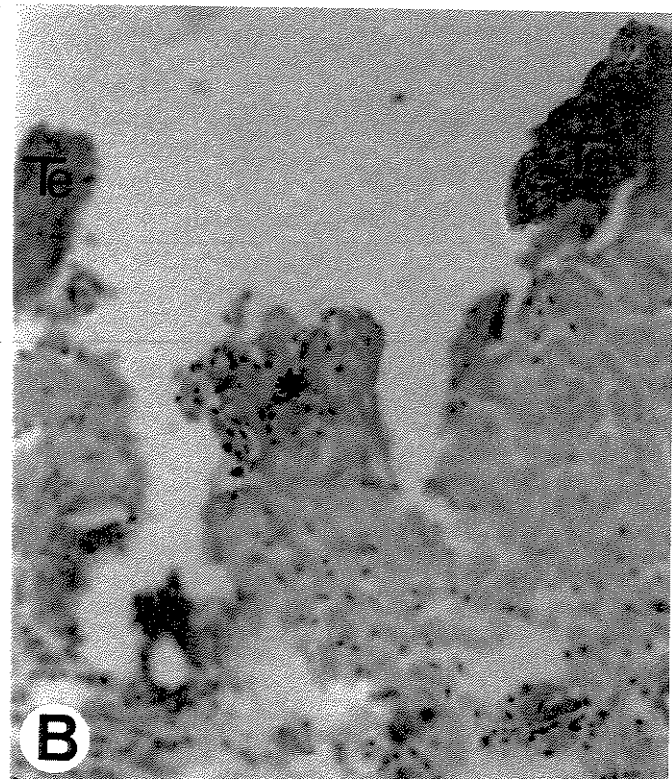
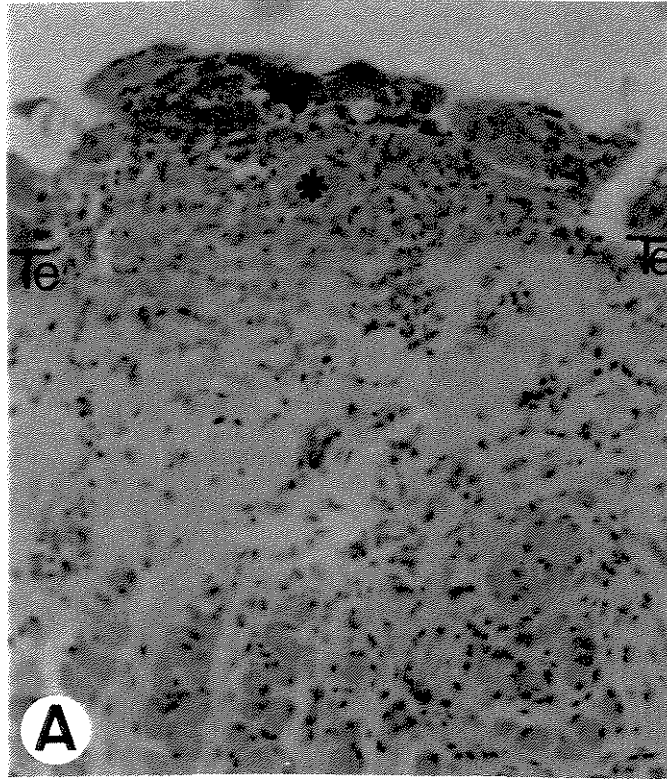
48 horas pós-cirúrgicas

Nos animais do grupo controle, aparentemente houve redução do tamanho da lesão cirúrgica. No tecido conjuntivo ocorreu diminuição do número de granulócitos e menor dissociação das fibras colágenas, o que indica abrandamento dos fenômenos exsudativos e conseqüente redução do edema local (Fig. 4A). Foi notada a presença de alguns linfócitos entre os macrófagos e neutrófilos, o que caracteriza a substituição de uma população celular por outra, no caso a substituição dos neutrófilos por linfócitos (Fig. 4 A). Aparentemente ocorreu espessamento do epitélio localizado nas bordas da ferida, com indícios de proliferação celular na camada basal e no tecido de granulação. Em um animal foi encontrada apenas a ferida exposta e contraída, sem o espessamento epitelial, com apenas leve indício de proliferação celular da camada basal. Em todos os animais do grupo controle foi observada a revascularização na região da lesão cirúrgica.

No grupo tratado, em todos os animais foi verificada retração do tecido epitelial apenas nas bordas da ferida e não foi observado o espessamento do epitélio. Apenas em um animal houve indício de proliferação celular (Fig. 4 B). O número de linfócitos presentes no tecido de granulação foi inferior ao encontrado nos animais do grupo controle, com exceção do grupo 24 horas pós-cirúrgicas, onde o número de linfócitos encontrados no grupo tratado foi maior que no grupo controle. No entanto, de modo geral, os animais apresentaram aumento da população de granulócitos, especialmente neutrófilos e macrófagos (Fig. 4D). O número de mastócitos encontrados foi maior que nos animais controle em todos os tempos de estudo.

Figura 4

- **A-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo controle, 48 horas após o procedimento cirúrgico. Formação de tecido de granulação onde antes se encontrava o infiltrado inflamatório (*). Tecido epitelial nas bordas da lesão (Te). Técnica: H/E. Aumento: 290X.
- **B-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo tratado, 48 horas após o procedimento cirúrgico. Notar as bordas da lesão (Te) e tecido de granulação empobrecido(*). Técnica: H/E. Aumento: 290X.
- **C-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo controle, 48 horas após o procedimento cirúrgico. Infiltrado inflamatório. Técnica: H/E. Aumento: 580X.
- **D-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal, 48 horas após o procedimento cirúrgico. Infiltrado inflamatório. Técnica: H/E. Aumento: 580X.



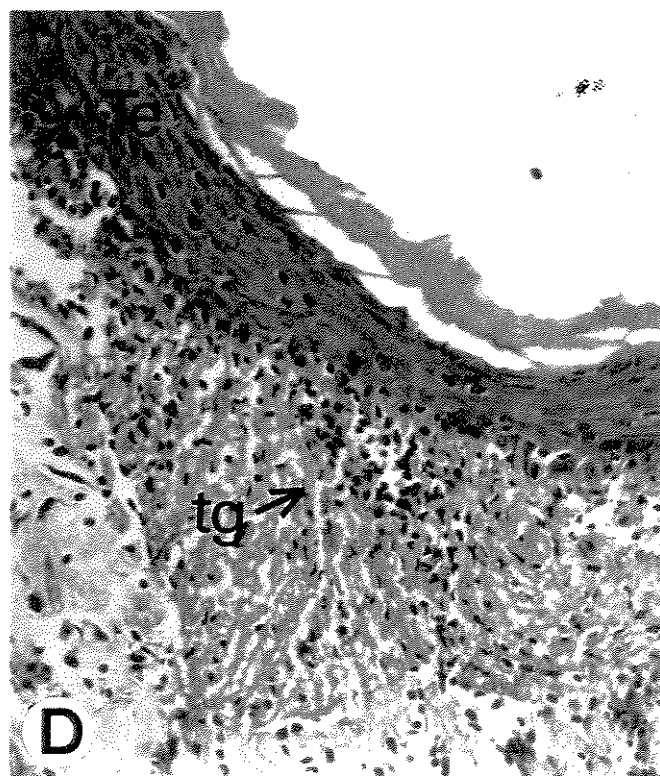
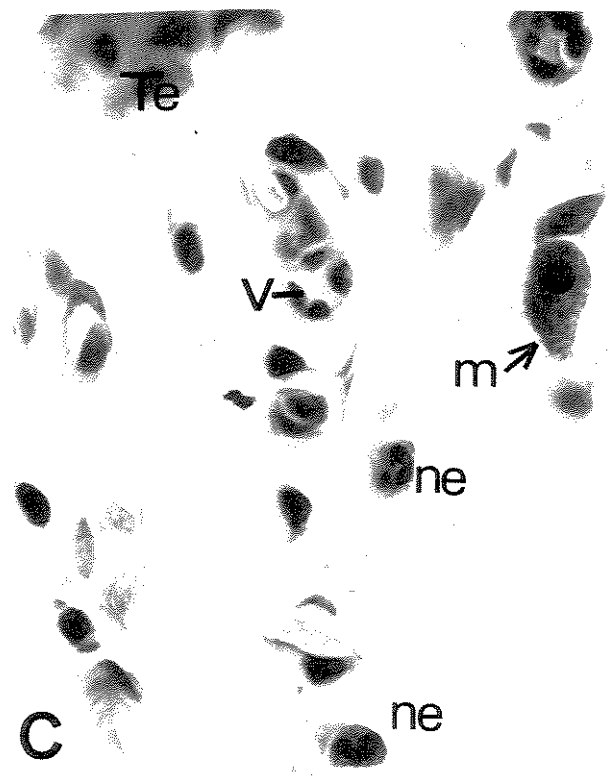
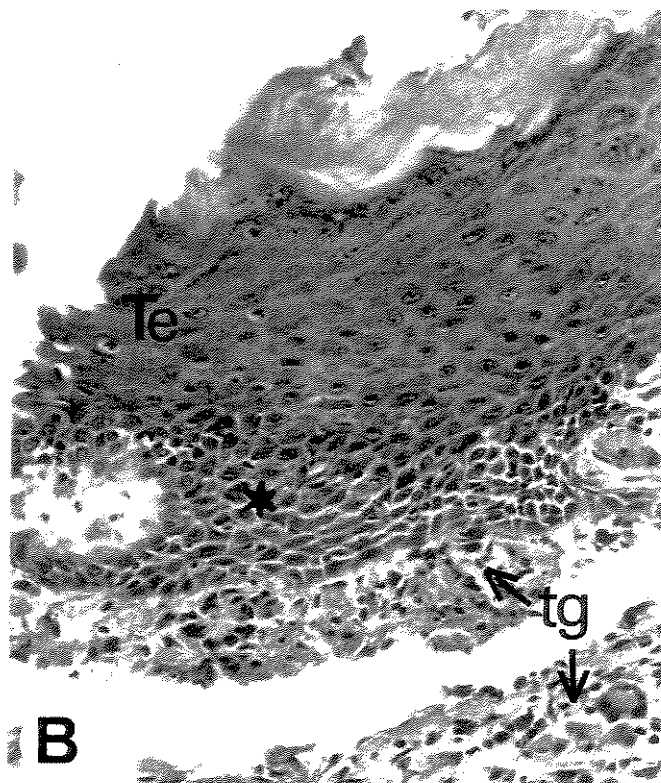
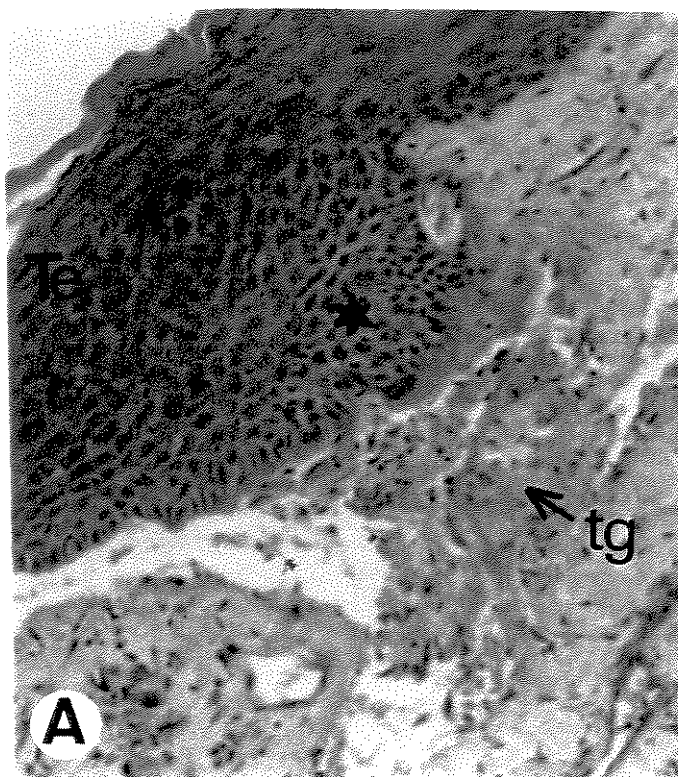
72 horas pós-cirúrgicas

Foi notada em todos os animais do grupo controle intensa proliferação de células resultando no espessamento do tecido epitelial. O espessamento epitelial variou de um animal para outro. Foi verificada a reepitelização parcial da ferida. Tal reepitelização pôde ser identificada pela presença de uma delicada membrana ou camada de células basais epiteliais na superfície do tecido de granulação, recobrindo total ou parcialmente a lesão cirúrgica (Fig. 5A). No tecido conjuntivo da mucosa puderam ser observados remanescentes do tecido de granulação, rico em vasos sanguíneos neoformados. Também foi notado aumento do número de fibroblastos na região onde antes se encontrava o tecido de granulação. Foi verificado em dois animais o início da produção de matriz extracelular (Fig. 5 A).

Nos animais do grupo tratado, a lesão cirúrgica pôde ser observada com as bordas retraídas e próximas à lesão abundante de tecido de granulação. A reepitelização da ferida ocorreu em dois animais (Fig. 5D), mas não houve nesses animais a proliferação tão intensa como verificada nos outros (Fig. 5B). Ocorreu espessamento epitelial, localizado nas bordas da ferida. Verificou-se discreta neoformação de vasos sanguíneos e presença de alguns mastócitos na região da lesão (Fig. 5C).

Figura 5

- **A-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo controle, 72 horas após o procedimento cirúrgico. Redução do tecido de granulação (Tg). Notar proliferação das células basais (*) Tecido epitelial (Te). Técnica: H/E. Aumento: 356X.
- **B-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo tratado, 72 horas após o procedimento cirúrgico. Tecido de granulação (Tg). Notar proliferação de células basais (*), Tecido epitelial (Te). Técnica: H/E. Aumento: 356X.
- **C-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo tratado, 72 horas após o procedimento cirúrgico. Presença de mastócito (m) no infiltrado celular. Vaso sanguíneo (v), tecido epitelial (Te), neutrófilos (n). Aumento: 580X. H/E.
- **D-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo tratado, 72 horas após o procedimento cirúrgico. Em alguns animais notou-se fechamento do epitélio em fina camada sobre exuberante tecido de granulação (*). Tecido epitelial (Te). Técnica: H/E. Aumento: 356X.



240 horas pós-cirúrgicas

Em todos os animais de ambos os grupos experimentais foi observada completa reepitelização da lesão cirúrgica. O tecido epitelial apresentou-se formado pelas quatro camadas celulares que o identificam: basal, espinhosa, granular e córnea ou queratinosa. Nos animais do grupo controle as camadas estavam definidas e caracterizadas; foi notada formação de cristas epiteliais, o que, morfológicamente, sugere completa reparação do tecido lesado (Fig. 6A).

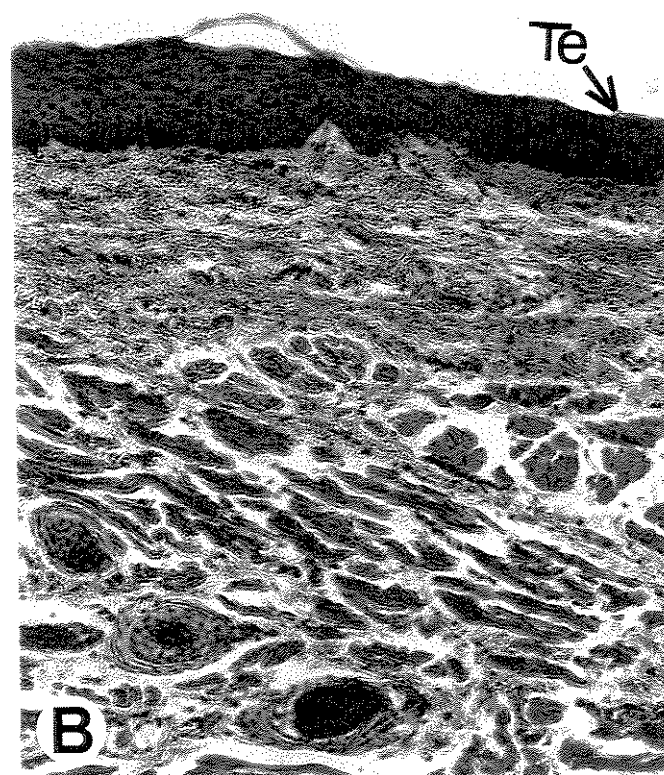
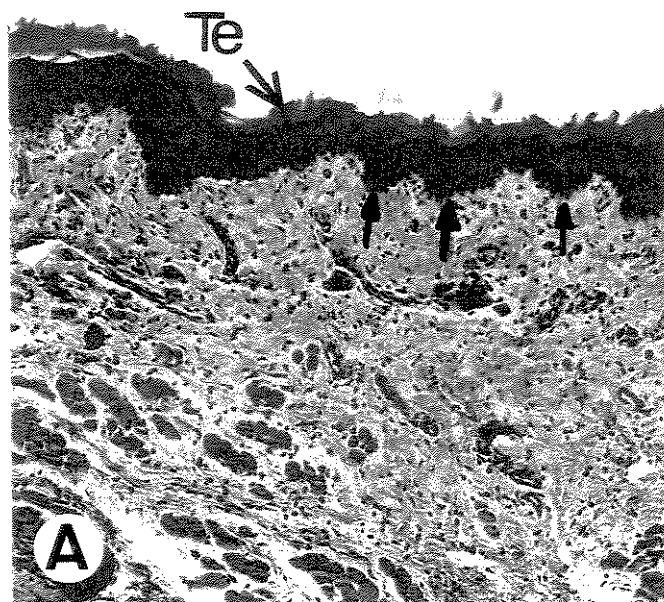
Nos animais do grupo tratado, o tecido epitelial era morfológicamente semelhante, com as camadas celulares definidas, porém sem a presença das cristas epiteliais (Fig. 6B).

Em todos os animais de ambos os grupos experimentais foi verificada grande quantidade de fibras colágenas no local onde antes existia a ferida e ausência de infiltrado inflamatório (Fig. 6 A e 6B).

Figura 6

- **A-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo controle, 240 horas após o procedimento cirúrgico. Ausência de infiltrado inflamatório. Completa reepitelização da região da ferida cirúrgica. Notar a formação de cristas epiteliais (seta). Tecido epitelial (Te), tecido. Técnica: H/E. Aumento: 142X

- **B-** Fotomicrografia de mucosa bucal da bochecha em corte transversal de animal do grupo tratado, 240 horas após o procedimento cirúrgico. Ausência de infiltrado inflamatório. Completa reepitelização da região da ferida cirúrgica. Notar ausência de papilas epiteliais (seta). Tecido epitelial (Te). Técnica: H/E. Aumento: 142X.



Microscopia Eletrônica de Transmissão

Nos animais de ambos os grupos experimentais foi observado epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, composto por quatro camadas distintas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e, por último, estrato córnea, queratinizada. Todas as células epiteliais apresentaram, em comum, tonofilamentos intermediários de queratina como um componente do seu citoesqueleto, confirmando a descrição feita por Squier (1994 e 1984).

No grupo de animais controle, as células basais estavam em íntimo contato com a lâmina basal. Foram encontrados vários hemidesmossomas entre as células basais e a lâmina basal. As células basais tinham forma cubóide e núcleos com poucas reentrâncias na superfície, acompanhando o formato celular. A cromatina estava distribuída de forma homogênea e o nucléolo era evidente na maioria das células observadas (Fig. 7A e 7C). O citoplasma mostrou-se pobre em organelas e pouco eletrodense. As mitocôndrias apresentaram forma oval ou circular, concentradas na porção proximal da célula. O retículo endoplasmático encontrado foi granular (apresenta ribossomos em sua superfície). Os ribossomos mostraram-se eletrodensos, porém de difícil visualização. O complexo de Golgi, geralmente, podia ser visualizado como fina membrana localizada lateralmente em relação ao núcleo. Não foram encontradas gotas lipídicas em nenhuma amostra do grupo controle (Fig. 8A).

Nos animais do grupo tratado, as células basais tinham forma poliédrica, não mantendo o padrão colunar ou cubóide; o núcleo apresentou forma irregular, com prolongamentos ou protuberâncias (Fig. 7B e 7D). A cromatina não estava distribuída de forma homogênea, condensando-se próximo à membrana nuclear. Em

algumas células era evidente o processo de degeneração nuclear, indicando a morte celular. No citoplasma foram encontradas as mesmas organelas citadas e descritas no grupo controle, porém com algumas alterações morfológicas; as mitocôndrias aparentemente eram em menor número se comparadas ao grupo controle. O complexo de Golgi, quando era visualizado, aparentemente estava menor. O retículo endoplasmático não apresentou alterações comparando ao grupo controle. Foi possível verificar a presença de gotas lipídicas em todas as amostras do grupo tratado (Fig. 8B). Estas gotas lipídicas de diversos tamanhos, geralmente se localizavam próximo ao núcleo celular. Um achado importante foi a aparente diminuição do número das junções celulares (desmossomas e hemidesmossomas). Em todas as camadas celulares foi observado o aumento dos espaços intercelulares, não observados nos animais do grupo controle. (Fig. 9C). Foi verificada a presença de figuras com aspecto de mielina em alguns animais do grupo 24 horas (Fig 9A). O número de mastócitos encontrados na região próxima à lesão nos animais tratados foi superior ao grupo controle. (Fig. 9E).

Figura 7

- **A-** Eletromicrografia de tecido epitelial da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo controle. Espaços intercelulares preservados (setas), células cubóides com núcleos acompanhando o formato celular (n) e respectivos nucléolos (e). Lâmina basal (lb). Aumento: 3240X.
- **B-** Eletromicrografia de tecido epitelial da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Espaços intercelulares aumentados (setas), núcleos celulares irregulares (n) e respectivos nucléolos (e). Notar presença de gotas lipídicas no interior citoplasmático (li). Lâmina basal (lb). Aumento: 3240X.
- **C-** Eletromicrografia de células basais da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo controle. Notar espaços intercelulares preservados (setas), mitocôndrias (mi), lâmina basal (lb), núcleo (n) e nucléolos (e). Aumento: 9292X.
- **D-** Eletromicrografia de células basais da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Notar espaços intercelulares aumentados e mitocôndrias com dilatação das cristas internas (mi). Observar a presença de gotas lipídicas no interior celular (li). Aumento de 9292X.

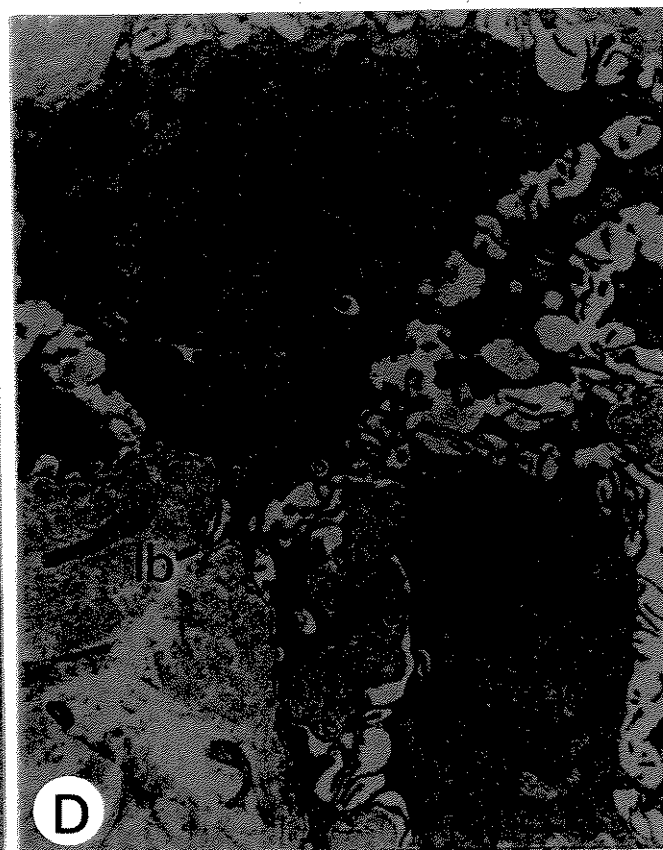
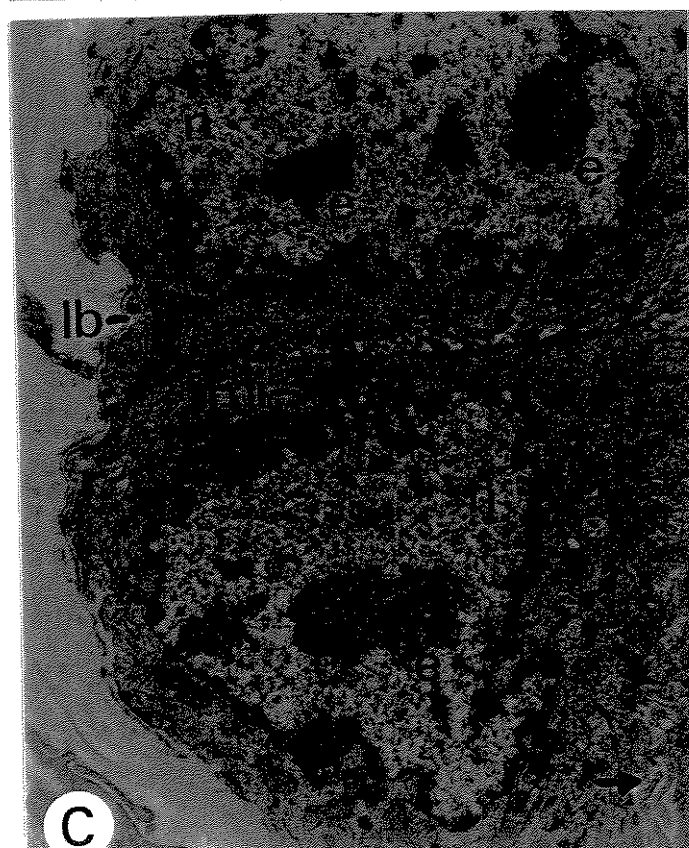


Figura 8

- **A-** Eletromicrografia de células basais da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo controle. Notar junções celulares em grande número (setas). Mitocôndrias preservadas (mi) Espaços intercelulares preservados (setas), núcleos celulares (n) e respectivos nucléolos (e). Aumento: 12000X.

- **B-** Eletromicrografia de células basais da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Notar junções celulares em menor número (setas). Mitocôndrias com aspecto arredondado (mi). Espaços intercelulares aumentados (setas), núcleos celulares (n) e respectivos nucléolos (e). Observar presença de gotas lipídicas no interior celular. Aumento: 12000X.

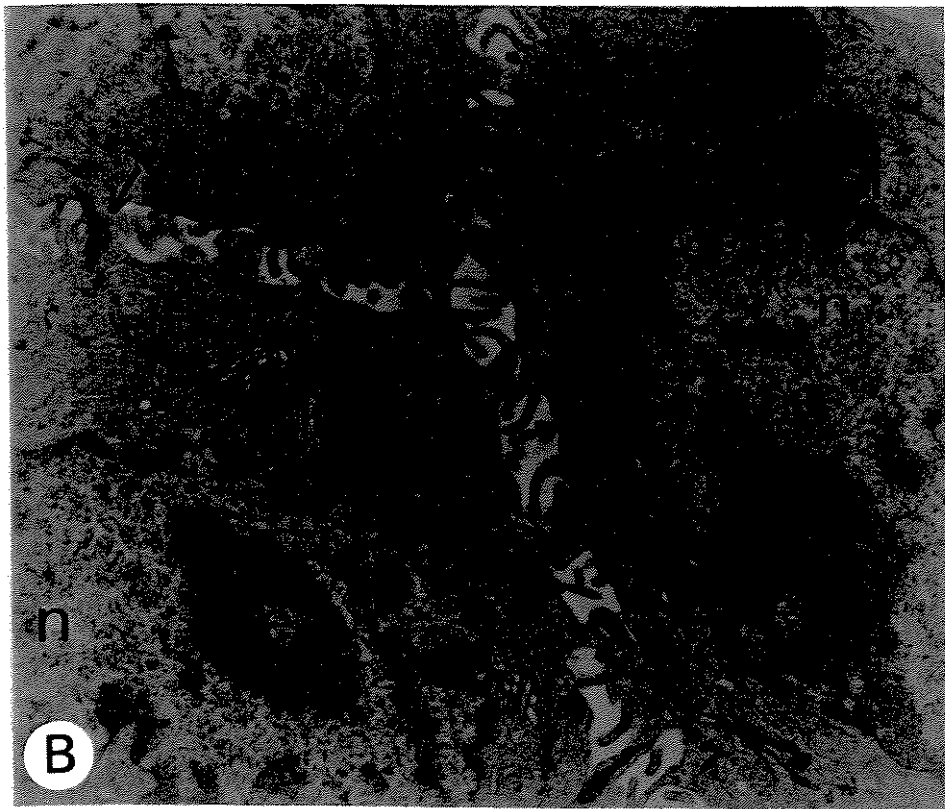
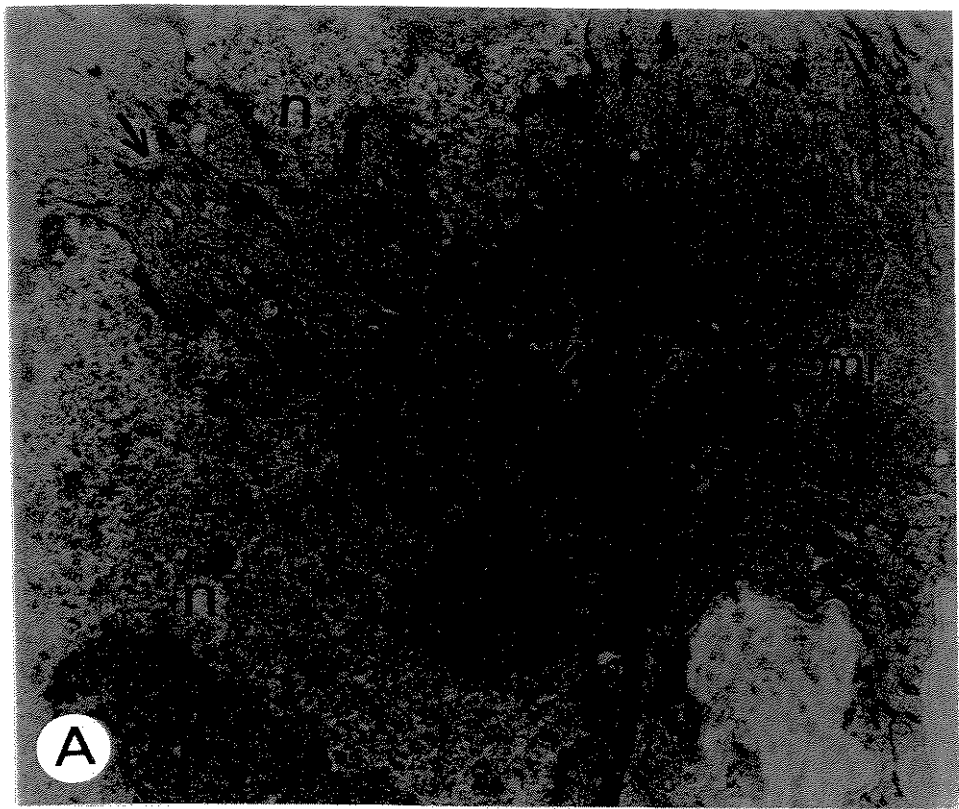
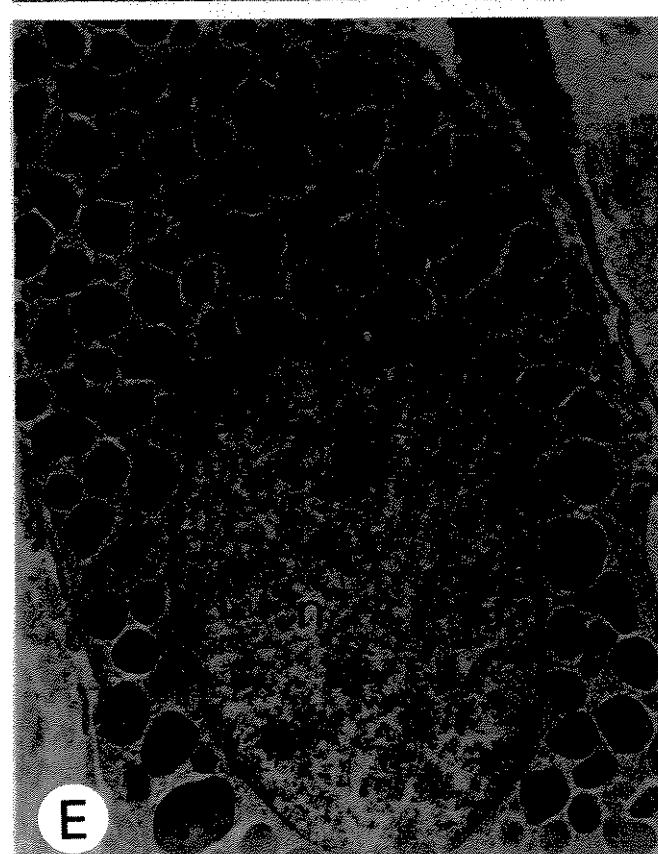
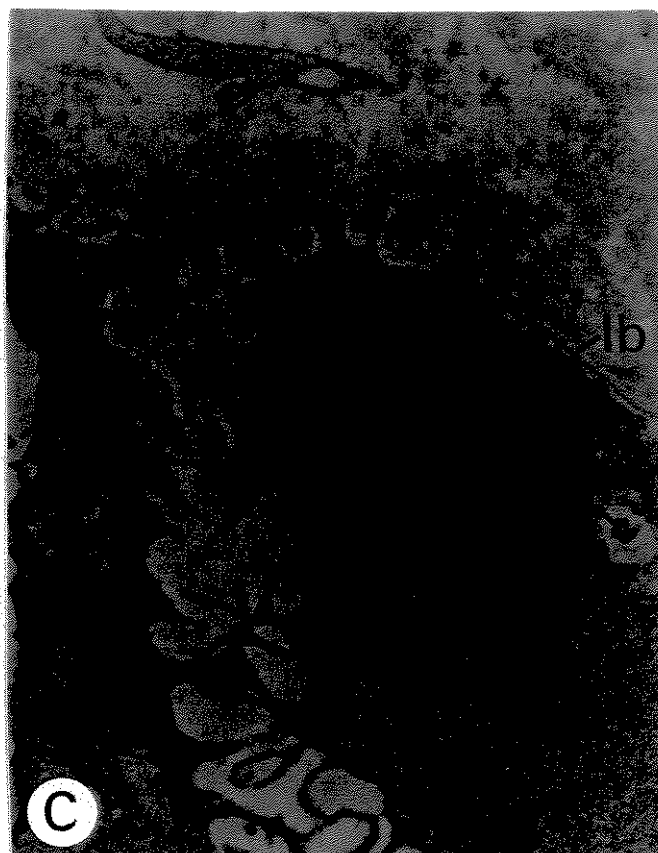
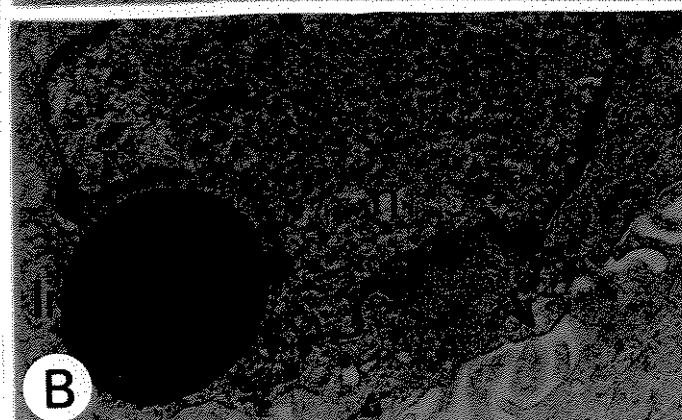


Figura 9

- **A-** Eletromicrografia de célula basal da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Presença de figuras com aspecto de mielina no citoplasma celular (me). Núcleo celular (n). Aumento: 20000X.
- **B-** Eletromicrografia de célula basal da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Espaço intercelular aumentado (seta), núcleo celular (n). Observar presença de vacúolo digestivo no interior do citoplasma. Lâmina basal (lb) Aumento: 15000X.
- **C-** Eletromicrografia de célula basal da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Espaços intercelulares aumentados (seta), núcleos celulares (n) e respectivos nucléolos (e). Aumento: 12000X.
- **D-** Eletromicrografia de camada basal do epitélio da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Espaços intercelulares aumentados (seta), núcleos celulares (n). Observar presença de neutrófilo (ne) entre as células basais (cb). Notar gota lipídica no citoplasma (li). Aumento: 12000X.
- **E-** Eletromicrografia de mastócito encontrado no infiltrado inflamatório de animal do grupo tratado (ma). Notar granulação específica eletrondensa (*), núcleo (n). Aumento: 12000X.



Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise das amostras de mucosa na região próxima à lesão revelou tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado (Fig. 10A). Nas amostras do grupo controle as células de formato poligonal estavam organizadas em justaposição, com algumas células em processo de descamação. Não foram encontradas áreas de erosão no epitélio observado. As dobras do tecido encontradas nas amostras foram consideradas normais devido à retração sofrida durante o processamento do material. Os espaços intercelulares estavam preservados (Fig. 12A e 12C).

Nas amostras da mucosa dos animais tratados, o epitélio tinha aparência espinhosa e padrão de organização atípico; as células em formato irregular, com bordas aumentadas e muitas delas em processo de descamação. Foram encontradas várias fissuras com aspecto sulcular (Fig. 10B). Em 11 das 20 amostras foram encontradas regiões de erosão superficial atingindo até a camada subsequente (Fig 11A e 11B). Em todas as amostras do grupo tratado, os espaços intercelulares estavam aumentados, evidenciando alterações na relação célula-célula, com comprometimento da função de barreira mecânica (Fig. 12B e 12D).

Figura 10

- **A-** Eletromicrografia de varredura de epitélio da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo controle. Epitélio com aspecto normal. Aumento: 540X.

- **B-** Eletromicrografia de varredura de epitélio da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Epitélio com células em descamação (seta) e presença de inúmeras fissuras na superfície do tecido (setas menores). Aumento: 540X.

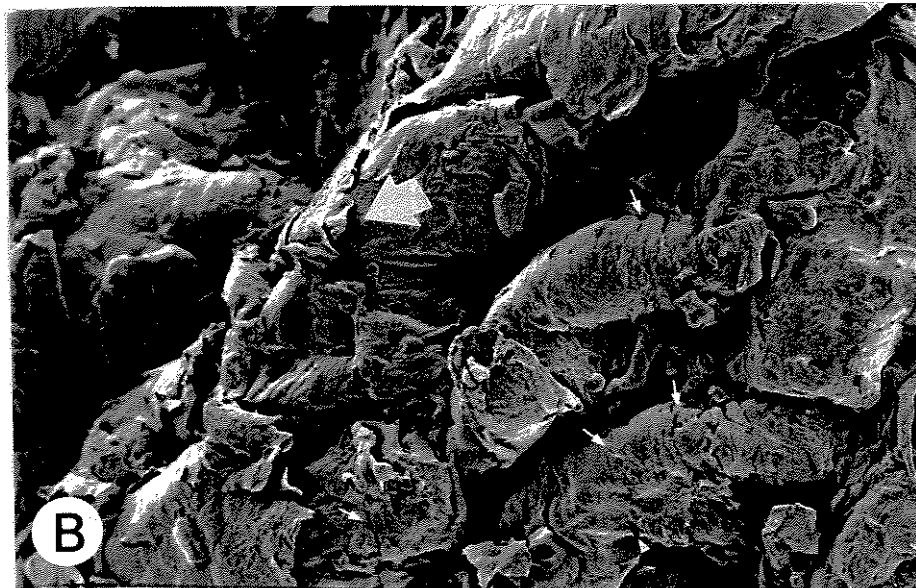
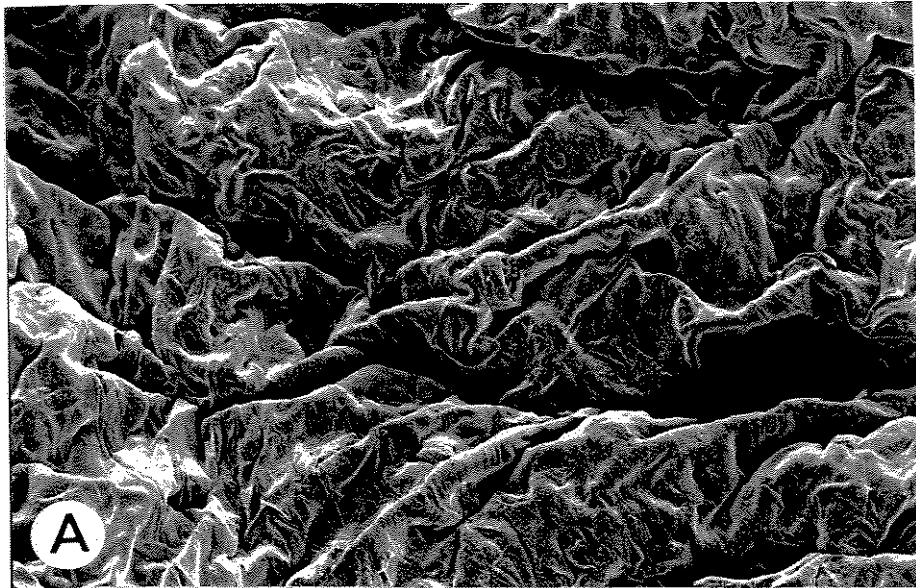


Figura 11

- **A-** Eletromicrografia de varredura de epitélio da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Epitélio com diversas áreas de erosão (★). Aumento: 540X.
- **B-** Eletromicrografia de varredura de epitélio da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Observar as muitas células em descamação, evidenciando o aumento do índice mitótico neste epitélio (seta). Regiões com erosão superficial (★). Aumento: 800X.

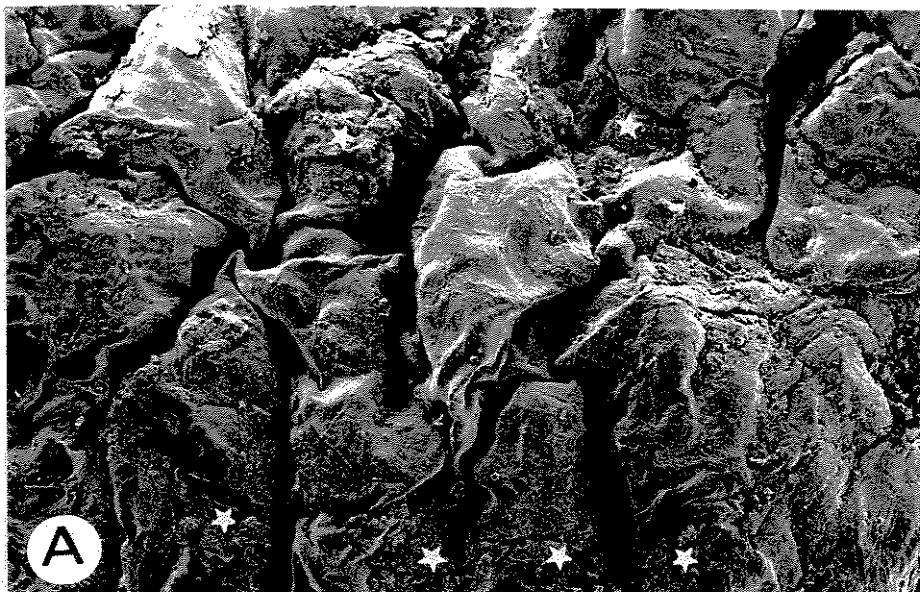
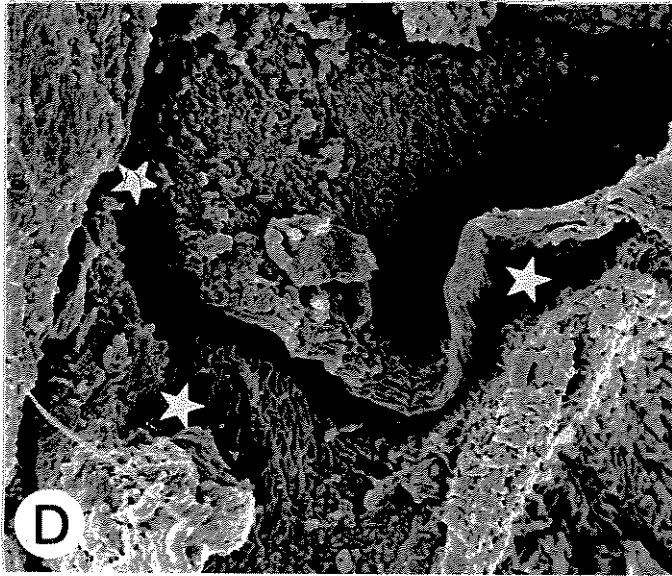
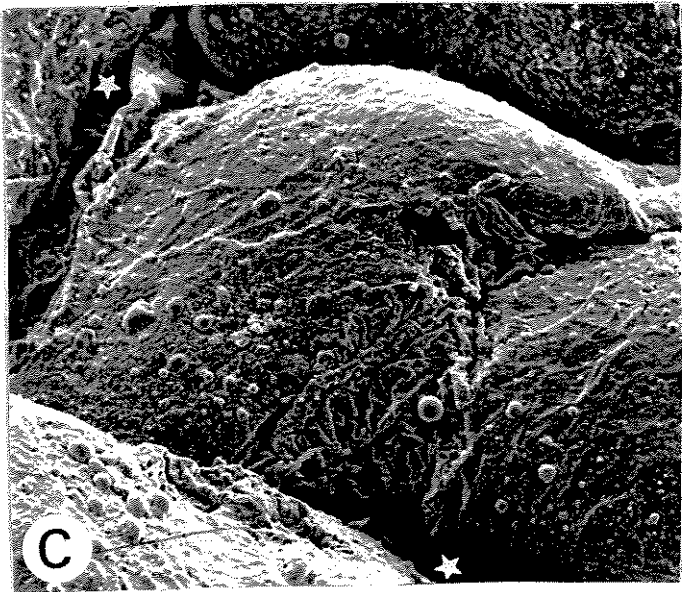
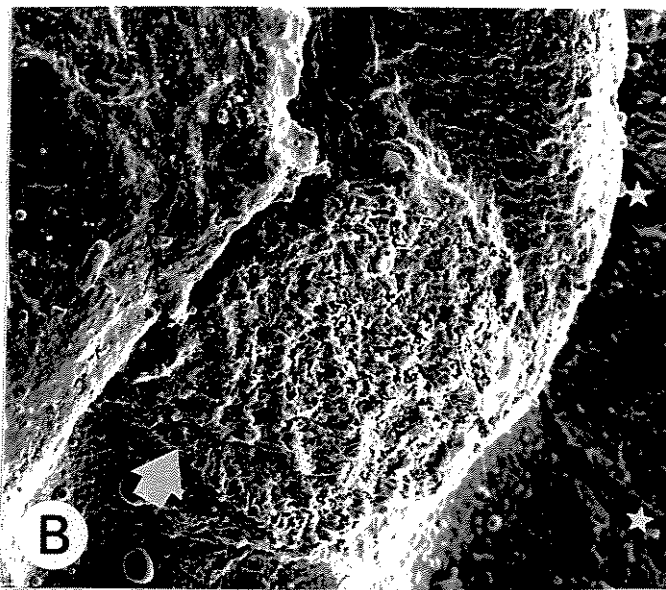
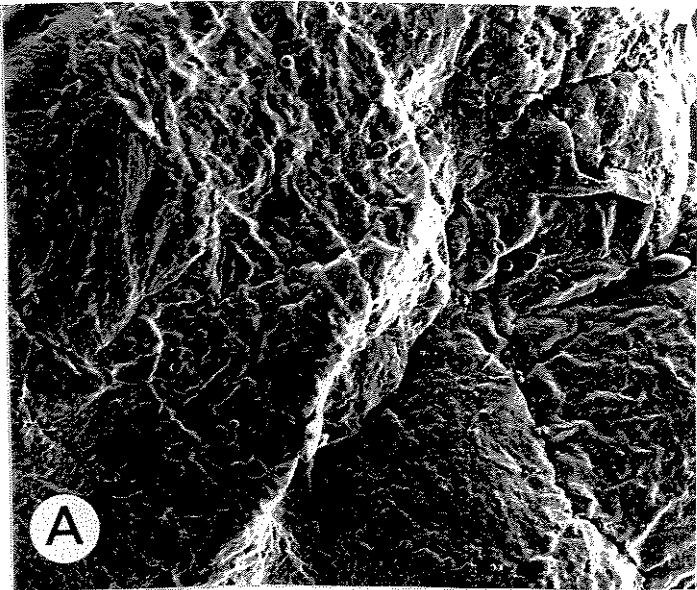


Figura 12

- **A-** Eletromicrografia de varredura de epitélio da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo controle. Aspecto da superfície próxima à região de comissura labial. Observar o aumento do aspecto queratinoso e a diminuição das dobras do tecido. Aumento: 1100X.
- **B-** Eletromicrografia de varredura de epitélio da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Detalhe de região ulcerada (seta). Aumento: 2000X.
- **C-** Eletromicrografia de varredura de epitélio da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo controle. Observar a relação intercelular preservada com espaços intercelulares normais (★). Detalhe para a junção celular (seta). Aumento: 4400X.
- **D-** Eletromicrografia de varredura de epitélio da mucosa bucal da bochecha de animal do grupo tratado. Notar espaços intercelulares aumentados, comprometendo a relação intercelular (★). Aumento: 4400X.



Análise estatística

Análise do estado nutricional dos animais

Os animais apresentaram estado geral satisfatório, ganho de peso corporal progressivo durante todo experimento até o momento do sacrifício. Os animais do grupo tratado apresentaram ganho menor de peso durante o estudo, este menor valor foi considerado significativo. (tabela 1).

Grupo	Momento do sacrifício	Variação de peso	
		S1 - peso inicial	S23 - peso final
Controle	24 horas	(217,57; 280,23)	(556,50; 576,98)
	48 horas	(214,23; 244,25)	(534,09; 572,39)
	72 horas	(194,55; 230,13)	(520,13; 585,07)
	240 horas	(209,79; 228,53)	(518,12; 587,16)
Tratado	24 horas	(207,71; 239,37)	(460,51; 516,37)
	48 horas	(219,39; 248,41)	(466,50; 517,94)
	72 horas	(197,87; 224,25)	(482,93; 465,00)
	240 horas	(201,91; 224,25)	(451,15; 472,25)

Tabela 1. Limites de confiança do peso segundo grupo e momento de sacrifício. Os valores indicam o limite inferior e o limite superior da variação de médias dentro do grupo fixado o tempo.

O consumo de ração e líquido (água, no grupo controle e água + etanol, no grupo tratado), pelos animais do grupo tratado foi menor quando comparado aos animais do grupo controle como pode ser observado respectivamente nos gráficos de 1 a 4. Porém no gráfico pode-se observar que o valor calórico total ingerido pelos animais do grupo tratado foi maior quando comparado ao valor ingerido pelos animais do grupo controle

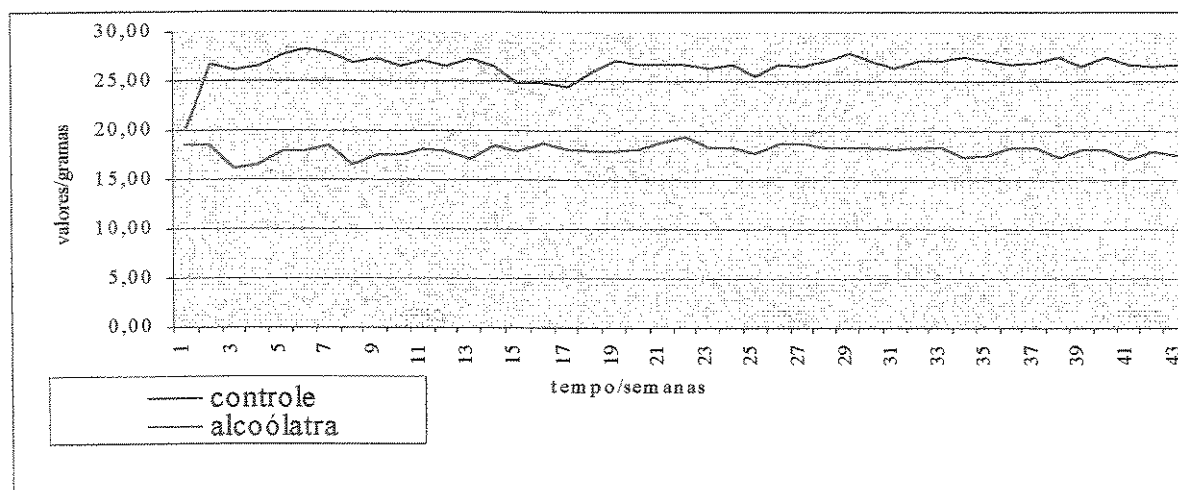


Gráfico 1: médias do consumo diário de ração por animal.

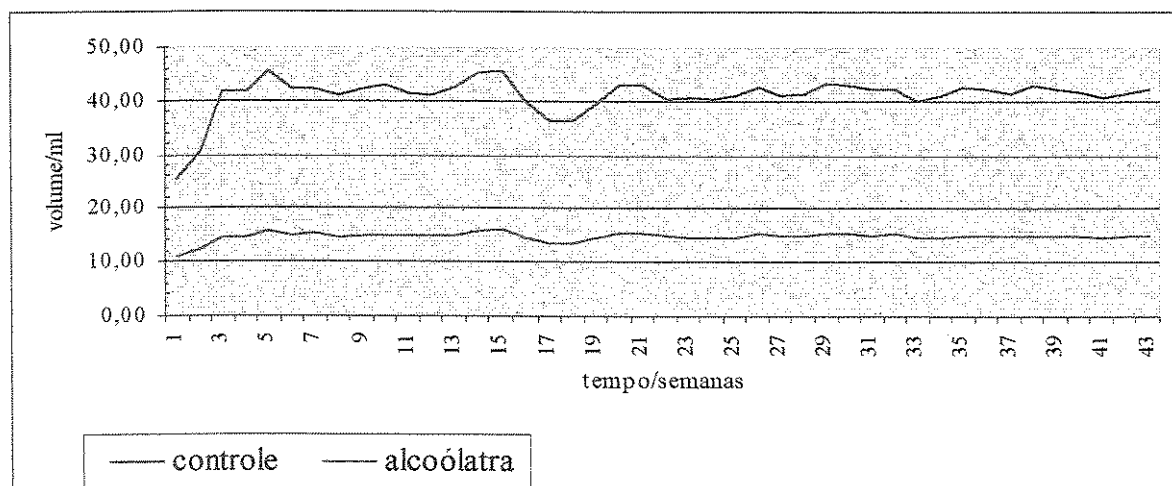


Gráfico 2: médias de consumo diário de líquido por animal.

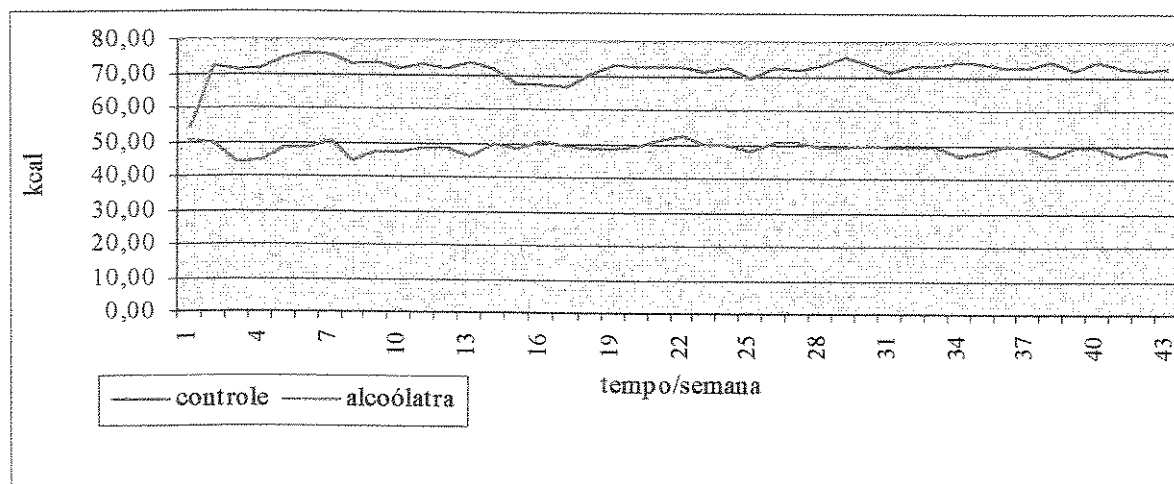


Gráfico 4: médias de consumo diário de kcal obtidas da ração por animal.

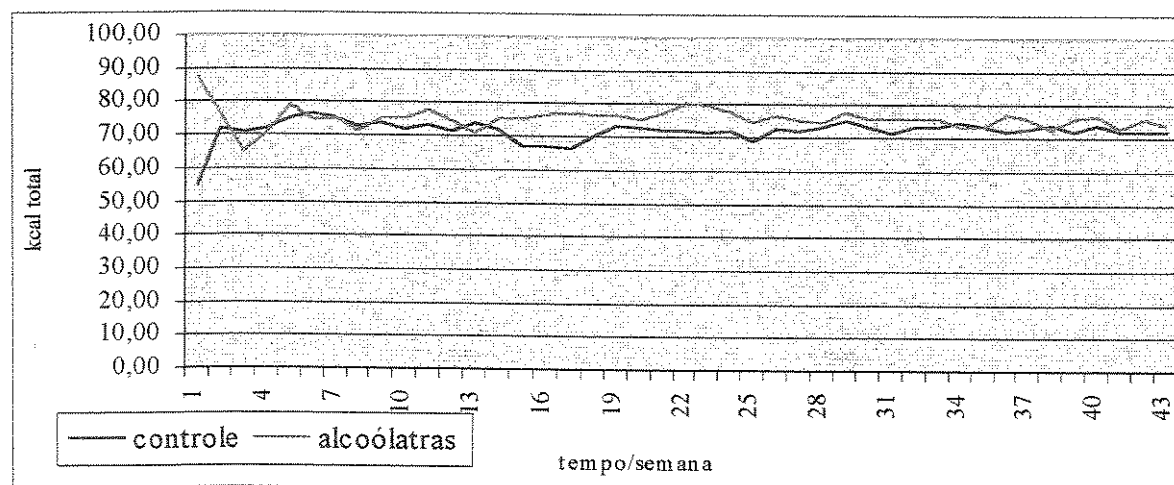


Gráfico 5: médias de consumo diário de kcal totais por animal.

Microscopia de luz

Número de camadas epiteliais

A contagem do número de camadas epiteliais revelou número inferior em todos animais do grupo tratado em relação aos animais do grupo controle, nos respectivos tempos, sendo significativa essa diferença entre os grupos apenas nos tempos de 48 e 240 horas pós-cirúrgicas. Não houve significância dentro dos grupos nos quatro tempo pós-cirúrgicos.

Grupo	Momento de sacrificio				Resultado do teste estatístico de momento
	M1	M2	M3	M4	
Controle	10,00 $\pm$ 2,50 a A	13,00 $\pm$ 2,00 b A	12,00 $\pm$ 2,00 a A	12,00 $\pm$ 1,50 b A	5,11 (P>0,05)
Alcoólatra	7,00 $\pm$ 2,50 a A	9,00 $\pm$ 1,00 a A	11,00 $\pm$ 1,50 a A	9,00 $\pm$ 1,50 a A	7,32 (P>0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	1,70 (P>0,05)	2,65 (P<0,01)	1,73 (P>0,05)	2,22 (P<0,05)	

Tabela 2- Mediana, semi-amplitude total e resultado do teste estatístico do número de camadas epiteliais segundo grupo e momento de sacrificio.

Número total de células no infiltrado inflamatório por campo observado

Os animais do grupo tratado apresentaram menor número total de células no infiltrado inflamatório em todos os tempos pós-cirúrgicos. Houve significância entre os grupos tratado e controle nos tempos de 24, 48 e 240 horas pós-cirúrgicas e dentro dos grupos em todos os tempos pós-cirúrgicos.

Grupo	Momento de sacrificio				Resultado do teste estatístico de momento
	M1	M2	M3	M4	
Controle	199,00 ± 8,50b C	189,00 ± 6,00b C	154,00 ± 7,50a B	91,00 ± 6,5b A	17,10(P<0,01)
Alcoólatra	150,00 ± 7,50a B	169,00 ± 9,50a B	150,00 ± 11,50a B	72,00 ± 6,50a A	14,52(P<0,01)
Resultado do teste estatístico de grupo	2,61 (P<0,01)	2,61 (P<0,01)	0,84 (P>0,05)	2,61 (P<0,01)	

Tabela 3- Mediana, semi-amplitude total e resultado do teste estatístico do número total de células no infiltrado inflamatório segundo grupo e momento de sacrificio.

Número de neutrófilos e sua respectiva porcentagem por campo observado

O número de neutrófilos encontrado nos anima do grupo tratado foi menor em todos os tempos pós-cirúrgicos. A diferença entre os grupos foi significativa nos tempos de 24 e 48 horas pós-cirúrgicas e dentro dos grupos em todos os tempos pós-cirúrgicos. Ao analisar-se a porcentagem de neutrófilos dentro do número total de células por campo observado (tabela 4), foi verificada significância entre os grupos nos mesmos tempos pós-cirúrgicos da tabela 3 e dentro dos grupos em todos os tempos pós-cirúrgicos.

Grupo	Momento de sacrificio				Resultado do teste estatístico de momento
	M1	M2	M3	M4	
Controle	129,0 ± 08,00b C	105,00 ± 11,00b C	72,00 ± 7,50a B	23,00 ± 8,00a A	17,86 (P<0,01)
Alcoólatra	64,00 ± 4,00 a B	71,00 ± 6,00 a B	63,00 ± 9,00a B	19,00 ± 3,50a A	13,37 (P<0,01)
Resultado do teste estatístico de grupo	2,62 (P<0,01)	2,61 (P<0,01)	1,57 (P>0,05)	1,37 (P>0,05)	

Tabela 4- Mediana, semi-amplitude total e resultado do teste estatístico do número de neutrófilos no infiltrado inflamatório segundo grupo e momento de sacrificio.

Grupo	Momento de sacrificio				Resultado do teste estatístico de momento
	M1	M2	M3	M4	
Controle	67,64 ± 4,16 b C	56,84 ± 6,19 b BC	44,44 ± 6,09 a AB	26,43 ± 7,53 a A	16,79 (P<0,01)
Alcoólatra	42,00 ± 4,32 a B	41,86 ± 4,83 a B	44,68 ± 5,38 a B	25,00 ± 5,90 a A	11,16 (P<0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	2,61 (P<0,01)	2,61 (P<0,01)	0,10 (P>0,05)	0,31 (P>0,05)	

Tabela 5- Mediana, semi-amplitude total e resultado do teste estatístico da porcentagem de neutrófilos no infiltrado inflamatório segundo grupo e momento de sacrificio.

Número de linfócitos e sua respectiva porcentagem por campo observado

A contagem do número de linfócitos demonstrou que nos animais do grupo tratado o menor valor encontrado valor foi significativo no tempo de 48 horas pós-cirúrgicas e equivalente nos demais tempos pós-cirúrgicos. Houve diferença significativa na variação encontrada dentro do mesmo grupo em todos os tempos pós-cirúrgicos. A análise das respectivas porcentagens demonstrou que no tempo de 24 horas pós-cirúrgicas os animais do grupo tratado apresentaram maior porcentagem de linfócitos dentro do número total de células quando comparados aos animais do grupo tratado, sendo essa diferença significativa. No entanto no tempo de 48 horas pós-cirúrgicas essa menor porcentagem foi significativa nos animais do grupo tratado em relação aos animais do grupo controle. Dentro dos grupos houve significância na variação de valores em todos os tempos pós-cirúrgicos.

Grupo	Momento de sacrifício				Resultado do teste estatístico de momento
	M1	M2	M3	M4	
Controle	12,00 ± 5,00 a AB	53,00 ± 3,00 b C	19,00 ± 3,00 a B	9,00 ± 1,50 a A	15,65 (P<0,01)
Alcoólatra	17,00 ± 6,00 a B	27,00 ± 4,00 a C	17,00 ± 4,50 a B	9,00 ± 2,00 a A	15,32 (P<0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	1,37 (P>0,05)	2,61 (P<0,01)	0,74 (P>0,05)	0,87 (P>0,05)	

Tabela 6- Mediana, semi-amplitude total e resultado do teste estatístico do número de linfócitos no infiltrado inflamatório segundo grupo e momento de sacrifício.

Grupo	Momento de sacrifício				Resultado do teste estatístico de momento
	M1	M2	M3	M4	
Controle	5,88 ± 2,44 a A	28,02 ± 1,37 b C	11,87 ± 1,70 a B	10,34 ± 1,32 a B	16,21 (P<0,01)
Alcoólatra	11,40 ± 3,54 b A	15,97 ± 1,99 a B	11,72 ± 2,33 a A	13,04 ± 2,41 a AB	10,66 (P<0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	2,19 (P<0,05)	2,61 (P<0,01)	0,73 (P>0,05)	1,78 (P>0,05)	

Tabela 7- Mediana, semi-amplitude total e resultado do teste estatístico da porcentagem de linfócitos no infiltrado inflamatório segundo grupo e momento de sacrifício.

Número de mastócitos e sua respectiva porcentagem por campo observado

Os animais do grupo tratado tiveram o número superior de mastócitos em relação aos animais controles nos quatro tempos pós-cirúrgicos, porém essa diferença foi significativa entre os grupos apenas no tempo de 48 horas pós-cirúrgicas. Não houve variação significativa dentro dos grupos entre os diversos tempos pós-cirúrgicos. A análise das porcentagens (tabela 9) demonstrou a repetição dos dados encontrados na tabela 8.

Grupo	Momento de sacrifício				Resultado do teste estatístico de momento
	M1	M2	M3	M4	
Controle	$1,00 \pm 1,00$ a A	$0,00 \pm 0,50$ a A	$0,00 \pm 1,00$ a A	$0,00 \pm 0,00$ a A	2,98 (P>0,05)
Alcoólatra	$2,00 \pm 1,50$ a A	$2,00 \pm 1,50$ b A	$2,00 \pm 1,00$ a A	$0,00 \pm 0,50$ a A	4,26 (P>0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	0,77 (P>0,05)	2,15 (P<0,05)	0,45 (P>0,05)	1,50 (P>0,05)	

Tabela 8- Mediana, semi-amplitude total e resultado do teste estatístico do número de mastócitos no infiltrado inflamatório segundo grupo e momento de sacrifício.

Grupo	Momento de sacrifício				Resultado do teste estatístico de momento
	M1	M2	M3	M4	
Controle	$0,50 \pm 0,49$ a A	$0,00 \pm 0,27$ a A	$0,00 \pm 0,65$ a A	$0,00 \pm 0,00$ a A	2,72 (P>0,05)
Alcoólatra	$1,20 \pm 1,00$ a A	$1,25 \pm 0,88$ b A	$0,66 \pm 0,61$ a A	$0,00 \pm 0,69$ a A	1,66 (P>0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	0,97 (P>0,05)	2,11 (P<0,05)	0,55 (P>0,05)	1,49 (P>0,05)	

Tabela 9- Mediana, semi-amplitude total e resultado do teste estatístico da porcentagem de mastócitos no infiltrado inflamatório segundo grupo e momento de sacrifício.

Número de outras células e suas respectiva porcentagem por campo observado

A contagem do número de outras células presentes no infiltrado inflamatório revelou que nos animais do grupo tratado este número foi maior nos tempos de 24 e 48 horas pós-cirúrgicas e menor no tempo de 240 horas pós-cirúrgicas, havendo significância entre os grupos nos referidos tempos pós-cirúrgicos. Houve significância nas variações encontradas dentro dos grupos nos diversos tempos pós-cirúrgicos. A análise das porcentagens demonstrou que houve significância na diferença entre os grupos apenas nos tempos de 24 e 48 pós-cirúrgicas, não ocorrendo no tempo de 240 horas. Repetiu-se ainda a significância encontrada dentro dos grupos entre os diversos tempos pós-cirúrgicos.

Grupo	Momento de sacrificio				Resultado do teste estatístico de momento
	M1	M2	M3	M4	
Controle	51,00 ± 9,50 a B	27,00 ± 14,50a A	68,00 ± 10,50a B	55,00 ± 7,50b B	13,61 (P<0,01)
Alcoólatra	68,00 ± 9,00 b A	73,00 ± 10,50b A	64,00 ± 10,50a A	42,00 ± 7,00a A	11,42 (P<0,05)
Resultado do teste estatístico de grupo	2,30 (P<0,05)	2,61 (P<0,01)	0,31 (P>0,05)	2,61 (P<0,01)	

Tabela 10 Mediana, semi-amplitude total e resultado do teste estatístico do número de outras células no infiltrado inflamatório segundo grupo e momento de sacrificio.

Grupo	Momento de sacrificio				Resultado do teste estatístico de momento
	M1	M2	M3	M4	
Controle	25,64 ± 4,42 a B	14,22 ± 7,35 a A	42,60 ± 6,32 a C	63,23 ± 8,79 a D	17,86 (P<0,01)
Alcoólatra	45,63 ± 4,88 b A	42,45 ± 4,17 b A	42,68 ± 5,91 b A	58,35 ± 6,34 a B	12,99 (P<0,01)
Resultado do teste estatístico de grupo	2,61 (P<0,01)	2,61 (P<0,01)	0,73 (P>0,05)	0,94 (p>0,05)	

Tabela 11- Mediana, semi-amplitude total e resultado do teste estatístico da porcentagem de outras células no infiltrado inflamatório segundo grupo e momento de sacrificio.

Frações de volume citoplasmático e nuclear

A análise comparativa das frações de volume nuclear e citoplasmático revelou que o grupo de animais tratados tinham 12% menor volume nuclear quando comparados aos animais do grupo controle

Grupo	Fração de volume citoplasmático	Fração de volume nuclear
Controle	62,80 %	37,20%
Tratado	74,12%	25,88%

Tabela 12. Frações de volume nuclear e citoplasmático.

Os valores absolutos do controle de peso, ingestão de ração e líquido; ingestão calórica, assim como das análises morfométricas podem ser verificados, respectivamente, nas tabelas 13 a 19 no capítulo Anexo 1.

DISCUSSÃO

A preservação da integridade da mucosa bucal e seu imediato reparo após injúrias são um processo complexo. Fatores como idade, sexo, intensidade e frequência das lesões e estado geral do indivíduo podem interferir na proliferação e migração celulares, responsáveis pelo reparo tecidual. A presença de doenças sistêmicas ou distúrbios causados pelo uso abusivo de drogas, entre elas o álcool, afetam negativamente a reparação tecidual. Segundo TIRAPELLI, 1998, alterações inflamatórias na mucosa bucal, alta incidência de leucoplasias e diminuição da função secretória das glândulas salivares são conseqüências bastante conhecidas do uso abusivo do álcool.

No presente estudo, após análises sob luz difusa, não foram encontradas alterações macroscópicas, como mudança de cor, textura ou presença de fissuras na superfície do epitélio, entre os grupos controle e tratado nos períodos de 24, 48, 72 e 240 horas pós-cirúrgicas. A lesão não foi considerada como alteração morfológica, sendo analisado apenas o seu aspecto geral. Autores como ZORZETTO (1997) e MARTINEZ (1998), em seus respectivos estudos, também demonstraram que não houve alterações macroscópicas na mucosa bucal entre os animais do grupo tratado e controle.

As análises em microscopia de luz evidenciaram ligeiro retardamento da reparação tecidual, principalmente nas primeiras 48 horas pós-cirúrgicas. Em todos os animais do grupo tratado, pôde-se observar a alteração na velocidade de migração leucocitária, com diminuição dos sinais exsudativos. Porém, passadas as primeiras 72 horas pós-cirúrgicas, o retardo foi recuperado e os animais apresentaram aceleração no processo de reparação tecidual. Isto pode ser demonstrado através do aumento de mitoses na camada basal do epitélio nesses animais. BENVENISTE (1981), após estudar a formação do tecido

de granulação em camundongos tratados, observou que as células de defesa migravam mais lentamente nos animais tratados em relação aos animais não tratados. No entanto, após as primeiras 72 horas pós-cirúrgicas, a autora descreveu o aumento da atividade celular, nos animais tratados, incluindo maior produção de colágeno que nos animais não tratados.

Nesse caso, o período de abstinência de 72 horas pós-cirúrgicas pode ter resultado na resposta positiva para os animais tratados. Se a dieta com solução de etanol tivesse sido mantida, certamente se observaria outra resposta tecidual. Se for levado em consideração o padrão de comportamento de indivíduos alcoólatras, sabe-se que invariavelmente tais indivíduos não mantêm o período de abstinência requisitado pelos profissionais de saúde, expondo dessa forma a lesão bucal, seja ela cirúrgica ou não, ao contato direto com a droga, resultando num processo de reparação tecidual mais lento e com maiores índices de infecção.

A contagem histomorfométrica do número de camadas epiteliais, no presente estudo, demonstrou que, nos animais tratados, havia uma ligeira redução do número das referidas camadas. Essa diminuição pode estar relacionada com maior descamação epitelial e, portanto, com maior número de trocas celulares nos animais tratados. Segundo OGDEN (1999), seria uma resposta do organismo à agressão direta causada pela solução de etanol. Nos animais tratados as células basais apresentaram um padrão mitótico aumentado em relação aos animais do grupo controle, assim como todo o processo de diferenciação das células basais em queratinócitos. A descamação celular nos animais tratados ocorreu em tempo menor em comparação ao do grupo controle. Isso pôde ser constatado observando-se células com núcleos nas camadas granulosas e córnea de alguns animais tratados, o que não ocorreu nos animais controles. Esse padrão aumentado da atividade mitótica nas células

basais também foi observado por ZUCOLOTO (1978), em ratos após ingestão crônica de álcool. Nesses animais as células epiteliais que recobrem as vilosidades intestinais apresentaram aumento da atividade mitótica. Com base em tais dados pode-se afirmar que, passado o período crítico de resposta inflamatória aguda, os animais tratados recuperaram a capacidade proliferativa e finalizaram a reparação tecidual.

A contagem histomorfométrica de células do infiltrado inflamatório mostrou que o número de linfócitos nos grupos tratados 24, 48 e 72 horas pós-cirúrgicas foi significativamente menor. Portanto, nesses animais o alcoolismo crônico interferiu na produção e na migração linfocitária, retardando a chegada das células ao local da injúria. Segundo LARANJEIRA (1996), uma das conseqüências imediatas do consumo crônico do álcool é a diminuição da resposta imunológica no organismo, seja com relação à menor ou tardia ativação dos fatores complemento, ou especificamente na diminuição da produção e maturação dos linfócitos. Além disso, a diminuição da aderência e mobilidade dessas células de defesa altera a função dos macrófagos e facilita a disseminação das infecções. Dessa forma, pode-se afirmar que o período de maior risco à infecção nesses indivíduos são as primeiras 48 horas.

As observações em microscopia eletrônica de transmissão demonstraram, nos animais tratados, aparente aumento dos espaços intercelulares e menor número de adesões celulares em todas as camadas do epitélio. Isso sugere a diminuição da proteção mecânica da mucosa nesses animais. ZORZETTO (1997) e MARTINEZ (1998) demonstraram aumento dos espaços intercelulares nas células da camada basal e intermediária da mucosa bucal de ratos submetidos ao alcoolismo crônico. As principais

alterações foram os aumentos dos espaços intercelulares e a presença de gotas lipídicas no citoplasma dessas células.

Foram observadas alterações morfológicas no núcleo e organelas citoplasmáticas em todos os animais tratados. O núcleo das células era irregular e com protuberâncias no seu envelope. Aparentemente, as organelas citoplasmáticas também apresentaram redução de tamanho e número e alterações na forma, como por exemplo, a dilatação das cristas mitocondriais e menor área ocupada pelo retículo endoplasmático rugoso.

OLIVEIRA (1993), após estudar os efeitos do álcool no desenvolvimento embrionário da mucosa do palato de ratos, demonstrou aumento do volume citoplasmático, total e nuclear das células basais, maior espessura epitelial e diminuição da camada córnea (ortoqueratina). OGDEN (1999) relatou, após análise da mucosa bucal de pacientes tratados, decréscimo da área celular e redução da área nuclear nas células do grupo tratado.

Pôde-se observar, nos animais tratados, aparente aumento do volume nuclear das células basais em relação ao volume total da célula quando comparados aos animais controles. Por outro lado, houve aparente diminuição do volume total celular nesses animais. A aparente diminuição do volume total, ou seja, a provável atrofia epitelial, confirma o efeito deletério do álcool sobre o tecido, enquanto houve contato direto da droga com as células epiteliais (OGEDN, 1999; OGDEN 2000, . Por outro lado, o aparente aumento do volume celular indica maior atividade mitótica dessas células. MAIER (1999) e MASCRÈS (1984) observaram, respectivamente, atrofia epitelial na mucosa bucal e esofágica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico, o que, segundo Mascrès, se deu devido à redução no tamanho da célula basal.

Na análise realizada em microscopia de varredura, os animais tratados apresentaram maior número de fissuras na superfície do epitélio que os animais do grupo controle. Além dessas fissuras, a presença de espaços celulares aumentados e o aspecto rugoso da superfície do epitélio levaram à conclusão de que ocorreu uma ação direta da solução de etanol sobre a mucosa bucal, durante o período em que o animal recebeu dieta à base de solução de etanol. Essa ação direta sobre a mucosa pode ser considerada um fator determinante no aparecimento das leucoplasias. Autores como BOFFETA (1992), JOVANONI (1993) e MASCRÈS (1981) relatam rompimento da superfície da mucosa bucal e diminuição da camada de queratina nos animais tratados, em relação aos animais não tratados. Segundo os autores, estas alterações estariam associadas à presença de alto índice de infecções locais.

Com relação ao período de reparação completa da lesão, os animais tratados apresentaram cicatrização completa da lesão após 240 horas pós-cirúrgicas, assim como os animais controles. Após 240 horas pós-cirúrgicas, constataram-se como diferença entre os dois grupos apenas a formação das cristas epiteliais típicas do tecido nos animais do grupo controle e a ausência ou menor número nos animais tratados. Alguns autores como SQUIER (1996) e CATE TEM (1994) classificam como epitélio maduro aquele que possui tais papilas digitais e organização das fibras colágenas. Para avaliar tais parâmetros, seriam necessárias outras técnicas que não foram utilizadas neste estudo.

Alguns autores relatam que animais tratados apresentam um crescimento lento do organismo em relação aos animais não tratados ou isocalóricos (FISH, 1941, MENDENHALL, 1993; RATCLIFFE, 1972; NOEL-JORAND, 1992). O acompanhamento do estado geral dos animais no presente estudo demonstrou que ambos os grupos apresentaram ganho de peso durante todo o período experimental. Durante o

experimento, o ganho de peso, o consumo de ração e líquido nos animais do grupo tratado, foram menor que no grupo controle, no entanto, a menor ingestão nutricional não afetou o estado geral dos animais tratados.

Segundo O NATIONAL RESEARCH CONCIL (2000), a quantidade de calorias que um rato adulto deve ingerir diariamente, para manutenção de um estado nutricional satisfatório, é de $112\text{Kcal /Kg}^{0,75}$ de peso corporal, ou o equivalente em ração que varia de 17 a 21 gramas. Esse valor corresponde a 50% a mais que a taxa basal representada pela soma de necessidades para a produção de calor basal, atividades físicas, alterações na temperatura ambiente e necessidades com o consumo e utilização da energia alimentar. No presente estudo, os cálculos nutricionais foram baseados nos valores de energia metabolizável da ração oferecida aos animais controles e da ração mais a mistura etanol + água para os animais tratados. VIEIRA (1992) cita em seu estudo que a ração Nuvilab CR-1 atende aos requerimentos estabelecidos pelo National Research Concil para ratos e camundongos. Segundo o fabricante, a ração Nuvilab CR-1 fornece energia média metabolizável de 2,70 Kcal/g, e a solução de etanol diluída 25% fornece o equivalente a 1,40Kcal/g. Como se pôde observar, na ingestão média de ração/líquido pelos animais, o valor de 17 gramas de ração ou o equivalente em calorias foi satisfatoriamente alcançado por todos os animais deste estudo, incluindo os animais do grupo tratado.

Nos animais tratados, o valor total das calorias superou a média encontrada no grupo controle, devido à presença das calorias provenientes do álcool. No grupo controle, a ração é responsável por 100% do conteúdo calórico, enquanto no grupo tratado ela é responsável por apenas 64,20% em média, sendo os outros 35,80% correspondente às calorias vindas do álcool. O indivíduo alcoólatra obtém do álcool, segundo dados estatísticos do SENAD – 2000, de 43 a 57% das calorias totais ingeridas. Embora exista

contenda no meio científico sobre a utilização ou não dessas calorias, chamadas por LEHNINGER (1991) de calorias vazias, pelo organismo para sua própria manutenção, não foram computados esses valores como sendo de energia metabolizável. Portanto, para avaliação nutricional dos animais tratados, foram levadas em conta apenas as calorias vindas da ração.

É notório que o álcool possui duas vias de ação no organismo, sendo uma chamada de ação direta ou local, que ocorre sobre os tecidos onde há relação de contato com a droga, como o trato gastrointestinal, e a outra chamada sistêmica, onde o etanol alcança todas as células do organismo através da circulação sanguínea. (LIEBER, 1998; lieber, 1994). Na verdade, não é possível dissociar os efeitos sistêmicos do alcoolismo crônico, de seus efeitos diretos ou locais. Deve-se lembrar que, no alcoólatra, o estado nutricional geralmente sofre deterioração, com relativa perda da capacidade de absorção de nutrientes, ainda que não esteja caracterizado o quadro de desnutrição. Esse é um dos efeitos secundários do alcoolismo. (LIEBER, 1999). No presente estudo, ao serem analisados os resultados, foi levado em consideração o efeito sistêmico da solução de etanol e o efeito direto sobre a mucosa durante o período de 270 dias em que os animais receberam dieta, com solução de etanol, isto é, até o momento da cirurgia.

Portanto, as alterações encontradas nos animais foram consideradas efeitos do consumo crônico da solução de etanol, seja de forma direta sobre a mucosa onde posteriormente foi feita a lesão, durante o período em que os animais receberam a dieta com solução de etanol, ou de forma indireta atuando sobre todos os sistemas do organismo durante o mesmo período. Embora durante o processo de reparação tecidual, os animais não tenham recebido solução de etanol na dieta, seus efeitos ainda estavam presentes.

Após análise de todos esses dados, pôde-se constatar que o consumo crônico de álcool diminuiu a migração leucocitária no local da lesão, retardou a formação do tecido de granulação e expôs o tecido por maior tempo à ação de agentes infecciosos e traumas mecânicos.

CONCLUSÕES

1. O consumo crônico da solução de etanol a 25% por 270 dias induziu a atrofia epitelial, produziu fissuras na superfície do epitélio, alterou a morfologia das células basais, aparentemente aumentou os espaços intercelulares e as deposições de gotas lipídicas no citoplasma celular.

2. Passado o período crítico de resposta inflamatória aguda, os animais do grupo tratado recuperaram a capacidade proliferativa e finalizaram o reparo da lesão cirúrgica. Portanto o consumo da solução de etanol retardou, porém não impediu, o processo de reparo tecidual.

3. Nas primeiras 48 horas pós-cirúrgicas, o consumo crônico de solução de etanol interferiu na produção e na migração de leucócitos para o local da lesão, expondo dessa forma o organismo a maior risco de infecção local.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DAMOUK J.D. Oral epithelial response to experimental chronic alcohol ingestion in hamsters. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 76(6): 736-41. Dec. (1993).
- BRATOLD P.M. Oral health and systemic health. *Aust. Dent. J.U.* 44 (3): 2-11, Sep. 1999.
- BENVENISTE K., THUT P. The effect of chronic alcohol on wound healing. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 166(4): 586-75 Apr. (1981).
- BOFETTA P., MASHBERG A., VINKELMANN R., GGARFINKEL L. Carcinogenic effect of tobacco smoking an alcohol drinking on the anatomic sites of oral cavity oropharynx. *Int. J. Cancer.* 52(4):530-33. Oct. (1992).
- BOZZO, R.O. Ação do diclofenaco sódico na reparação de incisões cirúrgicas. Estudo histológico em pele de ratos. 1996. *Dissertação de mestrado – FOP – Piracicaba – UNICAMP.*
- CAGNON V.H., GARCIA P.J., MARTINEZ F.E. Ultrastructural study of the coagulating gland of Wistar rats submitted to experimental chronic alcohol ingestion. *Prostate* 28(6): 341-6, Jun, 1996.
- CAMPANA A.O. et al. Experimental protein deficiency in adult rats. *Rev. Bras. de Pesq. Med. Biol.* 8 (3-4): 221-26, 1975.
- CARLINI-COTRIN B., CHASIN A. A. M. Blood alcohol content (BAC) and deaths from external causes: a study in the metropolitan area of São Paulo, Brazil. *J. Psych Drugs* 30, 2000.
- COELHO I.C.G. *Estrutura e ultraestrutura da próstata ventral e vesícula seminal de camundongos isogênicos (C57B16/J) submetidos à ingestão crônica de álcool.* 2000. Tese de mestrado, IB – Unicam, Campinas.
- COTRAN R.S. In: *Robbins Pathologic Basis of Diseases* cap I-IV: 1-112. WB Saunders - CO - Philadelphia 6th (International Edition). (1999).
- CRUCHLEY A.T. et al. Langerhans cells density in normal human oral mucosa and skin relationship to age, smoking and alcohol consumption. *J. Oral Pathol. Med.* 23:55-59 Feb. (1994).
- ECKERSLEY J.R., DUDLEY H. A. Wound and wound healing. *Br. Med. Bull.* 44 (2): 423 (1988).
- ERICSSON J. L. E. Mechanism of cellular autophagy. In *Lysosomes in biology and Pathology.* Amsterdam-London: North Holland Publishing Company, 1973. 345-394.

FISH V.B, NELSON V.E., The distribution of alcohol in the tissues of the rat. *Proc. Iowa Acad. Sci.* **49**:263-67 (1941).

FORTES J.R.A.; CARDO W.M. *Alcoolismo, diagnóstico e tratamento*. São Paulo: Savier , 1997. 327 p.

FRANCESCHI S. et al. Comparison of the effect of smoking and alcohol drinking between oral and pharyngeal cancer. *Int. J. Cancer.* **83** (1): 1- 4 (1999).

FRANCESCHI S. et al. Cessation of alcohol drinking and risk of cancer of the oral cavity and pharynx. *Int. J. Cancer.* **85**(6): 787-90, (2000).

GABBIANI G.; RYAN G.B.; MAJNE G. Presence of modified fibroblast in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* **27** (5) : 549-50 May (1971).

GARDNER E., GRAY D.J. Boca, língua e dentes in *Anatomia*. Guanabara Koogan, cap 61: 705-8, 6ª Edição, 1978.

GREÁ (Grupo interdisciplinar de estudos de álcool e drogas).Disponível em: <http://www.usp.br/fm/grea/> . 12/01/2000.

HARRIS C. et al. Oral and dental health in alcohol misusing patients. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **21** (9) :1707-09, 1997).

HOMANN N. et al. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis.***21**(4): 663-8, abr, 2000.

JABER M.A. et al. Risk factors for oral epithelial dysplasia- The role of the smoking and alcohol. *Oral Oncol.* **35**(2) 151-56, Mar, 1999.

JOVANOVIĆ A. et al. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **22** (10):459-62, Nov, 1993.

JUNQUEIRA L.C.; CARNEIRO C. O tubo digestivo in *Histologia Básica*. Guanabara Koogan – cap. 15:241-3 (1995).

KALANT H. Direct effects of ethanol on the nervous system *Fed. Proc.* **34** (10): 1930-41, Sep, 1975.

KELLER A.Z. et al. The association of alcohol and tobacco with cancer of the mouth and pharynx. *Am. J. Public Health*, **55**:1578-85, 1965.

KUCHINSKI, F. B. Glossário Histologia dental e periodontal. 8ª Edição, São Paulo, 2000.

LARANJEIRA R. Bases para uma política do tratamento dos problemas relacionados ao álcool e outras drogas no Estado de São Paulo. *J. Braz. Psiquiatr.* **45**(4): 191, 1996.

LEHNINGER A.L., *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Editora Savier, 1991. p. 543-44.

- LI T.K. The absorption, distribution and metabolism of ethanol and its effects on nutrition and hepatic function in *Tabakoff B, Medicals and Social aspects of alcohol abuses*. NY Plenum Press : 47-48, 1983.
- LIEBER C. Mechanism of ethanol drug nutrition interactions. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* **32** (6) 631-81, 1994.
- LIEBER, C.S. The influence of alcohol on nutritional status. *Nutr. Ver.* **46** (7):241-54 Jul, 1998.
- LIEBER, C.S.; ALBITAN C.S. Pharmacology and metabolism of alcohol including its metabolics effects and interaction with other drugs. *Clin. Dermatol.* **17** (4):365-79, 1999.
- MACCLUSKEY M. et al. The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. *Oral Oncol.* **35**(4): 409-14, Jul, 1999.
- MAIER H., TISCH M. et al. An association of chronic alcohol consumption with morphological alterations of the laryngeal mucosa in rats. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* **256** (5): 247-49 (1999).
- MAIER H. et al. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **18**(2): 387-91, Abr. 1994.
- MANDARIM-DE-LACERDA C.A. *Métodos quantitativos em morfologia*. EDUERJ –RJ, 1995.
- MANDARIM-DE-LACERDA C.A. What is the interest of normal and pathological morphological research to be quantitative? The example of steriology. *Braz. J. Morphol. Sci.* **16**(2) : 131-39, jul/dez. 1999.
- MARTINEZ, F. E. Estudo morfológico da vesícula seminal de ratos (*Rattus norvegicus*) submetidos ao alcoolismo crônico experimental.. Dissertação (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências. Botucatu, , 1993.
- MARTINEZ M., MARTINEZ F.E., Morphological changes on the hard palatine mucosa of rats (*Rattus norvegicus albinus*) after chronic alcohol consumption. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* **30**(3): 379-84, jul. 1998.
- MASCRÈS C.; JOLY J.G. Etude histochimique et ultrastructurale de la muquese buccale du rat après adminitration chronique d'alcool. *J. Biol. Buccale* **9**: 279-95, 1981.
- MASCRÈS C.; MING-WEN F.; JOLY J.G. Morphologic changes of the oesophageal mucosa in the rat after chronic alcohol ingestion. *Exp. Pathol.* **25**(3) 147-53, 1994.
- MENDENHALL C.L. et al. Impact of chronic alcoholism on the aging rat: changes in nutrition, liver composition and mortality. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **17** (4): 847-53, 1993.

MÜLLER P. et al. Tissue damage in the rabbit oral mucosa by acute chronic direct toxic action of different alcohol concentration *Exp. Pathol.* **24** (2-3) : 171-81, 1983.

NATIONAL RESEARCH CONCIL “ Nutrients requeriments of the laboratory rat”, in: *Nutrient Requeriments of Laboratory Animals – National Academy Press, Washington D.C.* : 11-79, 1995.

NOEL-JORAND M.C.; BRAS J. Nutrition profiles of chronic alcoholics. *Eur. J. Clin. Nutrit.* , **46** (7) : 517-26, jul. 1992.

NORMAN G.R., STREINER D.L. Biostatistic The bases essential. Mosby -year Boock, St. Louis, 1994.

OGDEN G.R.; WIGTH A.J.; RICE P. Effect of alcohol on the oral mucosa by assessed quantitative cytomorphometry. *J. Oral Pathol. Med.* **28**(5) 216-20, mai. 1999.

OGDEN G.R.; WIGTH A.J.; COWPE J.G. Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* **21**(1): 126-30, 1999.

OLIVEIRA C. Alcohol-induced alterations in the palatine epithelium of the rat fetus. *Braz. Dent. J.* **4**:19-28, 1993.

RATCLIFFE F. The effect of chronic ethanol administration on the grow of rats. *Arch. Int. Pharmacodyn Ther.* **197** (1) : 19-30, mai. 1972.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an eletron-opaque stain in eletron microscopy. *J. Cell. Biology*, **17**, 208. 1963.

RYAN G.B. et al. Myaofibroblast in human granulation tissue. *Hum. Pathol.* **5**:55, 1997.

SCHEINBERG, G. Alcoolismo online – Números. Disponível em: <http://www.alcoolismo.com.br/numeros.html> 22/05/2001.

SCHLECHT N.F. et al. Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of upper aero-digestive tract in Brazil. *Am. J. Epidemiol.* **150**(11): 1129-37 (and 1138-41), dez.1999.

SEGAWA K. et al. Chronic alcohol abuse leads to gastric atrophy and decrease gastric secretory capacity: a histological and physiological study. *Am. J. Gastroenterol.* **83**(4): 373-79, abr. 1988.

SIMANOWSKI U.A.; SUTER P.; STICKEL F. Esophageal epithelial hyperproliferation following long term alcohol consumption in rats: effects on age and salivary gland function. *J. Natl.. Cancer Inst.*, **85**(24):2030-33, 1993.

SLOMIANY B.L.; PIOTROWSKI J.; SLOMIANY A. Suppression of caspase-3 and nitric oxide synthase-2 during buccal mucosal ulcer healing: effect of chronic alcohol ingestion. *IUBMB Life*, **48** (1): 121-25, jul. 1999.

_____. Suppression of endothelin-converting enzyme-1 during buccal mucosal ulcer healing: effect of chronic alcohol ingestion. *Biochem. Biopsy. Res. Commom*, **271**(2): 318-22, mai. 2000.

SLOMIANY B.L. et al. Induction of buccal mucosa apoptosis with chronic alcohol ingestion. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **44**(2) 381-89, 1998.

SQUIER C.A.; GERSON S.J. The structure and function of oral mucosa. Oxford Pergamon – 1984. cap. 2, 3,4,7,8,10,11, 281 p.

SQUIER C.A; MURRAY W. HILL. The effect of aging in oral mucosa and skin. Boca Raton , 1994. cap. 3,7,8,9,10,11,12,13 e 15.

STEPHENS P. et al. An investigation of the interaction between alcohol and fibroblast in wound healing. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **25** (2):161-64, abr. 1996.

TALAMINI R. et al. Cancer of oral cavity and pharynx in non-smokers who drink alcohol and in non-drinkers who smoke tobacco. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**(24) 1901-03, dez. 1998.

TEM CATE, R. A. et al. Oral histology: development, structure and function. St. Louis: Mosby, 1994.

TIRAPELLI L.F. *Alterações morfológicas nas glândulas submandibulares de ratos (Rattus norvegicus) submetidos ao alcoolismo crônico*. 1998. Tese de Doutorado –IB -Botucatu – UNESP.

VIEIRA C.R.P. *Avaliação da qualidade nutricional e microbiológica de ração autoclavável para ratos e camundongos de biotério livres de patógenos específicos*. 1992. Dissertação de Mestrado - FEA – Unicamp – Campinas.

WANG S.L. et al. Effect of ethanol on epidermal grows factor receptor in buccal mucosa. *Biomed. Bioch. Acta.* **50** (7):879-84, 1991.

WATSON, M. L. Stainig of tissues sections for eletron-microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cythol.* **4**, 475. 1958.

WORD HEALTH ORAGANIZATION WHO statistical information system. Disponível em: <http://www.who.int/whosis/> . 03/04/2001.

WORD HEALTH ORAGANIZATION The ICD: 10 – classification of mental and behavioural disorders. Clinical description and diagnostic guidelines – 1993. Disponível em: <http://www.who.int/whosis/icd10/> . 21/06/2001.

ZORZETTO D.L.G. Estudo ultraestrutural da mucosa bucal da bochecha ratos, *Rattus norvegicus*, submetidos ao alcoolismo crônico experimental. 1997. Dissertação de mestrado – IB- Botucatu.

ZUCOLOTO S.; ROSSI M. A. Effect of chronic ethanol consumption on morphologic and mitotic index in rat small intestine. *Digestion*, **19**(5): 277-83, 1979.

ANEXO 1

Tabela 13- Controle de peso dos animais durante todo o experimento

grupo	tempo	sac.	animal	peso S1	peso S2	peso S3	peso S4	peso S5	peso S6
controle	24 horas		A	284,50	287,30	333,00	352,80	389,20	397,20
			B	234,00	247,00	285,00	311,00	332,10	347,80
			C	217,50	257,30	296,00	324,10	343,10	358,10
			D	257,50	289,00	343,00	372,00	382,00	390,00
			E	251,00	281,00	301,00	334,10	368,50	369,70
	48 horas		A	241,50	257,30	329,00	368,20	408,00	425,00
			B	229,50	241,60	293,00	312,70	340,40	372,00
			C	241,00	256,30	281,00	332,50	375,00	388,00
			D	218,20	243,00	314,00	321,40	339,10	354,20
			E	216,00	220,10	273,00	301,00	323,60	342,00
	72 horas		A	206,00	246,00	284,40	316,90	353,90	370,00
			B	207,70	235,30	262,80	299,70	325,20	343,00
			C	195,50	230,50	265,50	298,00	333,30	350,00
			D	233,00	267,00	281,00	310,20	343,40	364,10
			E	219,50	249,30	271,00	295,00	329,70	349,00
	240 horas		A	232,00	259,00	304,00	337,10	377,60	408,00
			B	216,60	242,00	284,30	303,00	341,00	359,20
			C	212,00	237,20	272,00	295,00	329,30	350,00
			D	218,20	226,80	259,00	281,30	311,20	325,30
			E	217,00	238,00	282,80	313,00	334,20	366,00
Tratado	24 horas		A	218,70	210,80	218,90	224,80	249,50	257,20
			B	214,00	203,90	218,50	227,00	239,40	252,10
			C	219,50	211,00	219,30	228,40	235,20	241,40
			D	246,00	240,20	238,50	241,50	254,10	262,30
			E	219,50	209,00	216,20	229,50	245,30	260,00
	48 horas		A	238,50	229,20	235,30	241,00	252,30	264,00
			B	235,90	221,00	227,80	247,90	261,40	278,50
			C	250,10	224,80	238,00	256,50	264,80	280,00
			D	222,00	217,40	227,50	241,20	257,20	269,50
			E	223,00	218,50	223,50	234,80	241,00	258,70
	72 horas		A	217,50	210,00	219,80	229,00	238,50	254,50
			B	219,40	209,80	220,50	235,40	242,80	269,50
			C	200,00	195,40	214,00	237,20	253,00	267,20
			D	198,90	196,20	213,50	234,70	256,90	278,00
			E	219,50	211,00	220,00	238,70	251,00	275,30
	240 horas		A	223,70	217,50	229,50	240,00	253,80	266,90
			B	217,00	209,50	217,90	238,50	254,00	278,60
			C	199,50	187,00	212,80	229,10	249,50	272,00
			D	210,20	201,30	217,40	230,00	257,00	279,50
			E	215,00	205,00	219,60	238,40	254,50	267,10

peso S7	peso S8	peso S9	peso S10	peso S11	peso S12	peso S13	peso S14	peso S15
419,00	439,00	447,60	439,20	444,10	453,70	451,00	476,80	487,20
369,80	373,20	390,10	389,20	401,00	407,00	385,00	402,10	411,80
371,00	374,10	387,10	386,00	395,50	399,60	390,00	405,40	412,90
402,00	418,50	447,60	449,10	454,00	460,20	444,00	460,90	478,30
386,10	400,20	433,30	421,00	420,00	426,50	425,90	434,30	439,00
446,80	463,00	482,70	483,50	489,00	507,50	508,00	515,00	530,00
393,20	416,60	404,50	401,90	409,70	423,60	417,50	424,60	439,50
399,50	405,60	425,20	428,00	438,30	444,00	438,50	444,60	449,50
362,00	371,00	374,20	386,00	382,80	388,10	392,00	402,70	423,50
341,00	351,00	369,00	359,40	372,00	377,80	380,00	384,00	409,30
369,00	397,00	417,00	411,90	430,80	444,20	449,50	455,30	468,10
355,00	351,10	363,20	369,00	370,00	376,70	379,20	381,30	407,00
358,90	378,50	390,70	392,00	399,80	409,00	410,00	413,80	429,00
379,20	394,20	406,40	400,50	409,00	431,60	420,00	432,30	460,00
374,90	396,10	383,30	384,20	392,50	402,60	409,50	407,60	425,00
411,00	428,50	451,00	449,00	458,20	461,30	481,00	477,80	483,00
376,20	375,00	391,00	387,00	390,00	398,50	410,00	412,00	432,00
361,30	370,00	385,00	392,00	395,20	398,30	401,50	394,80	408,50
329,80	339,50	344,90	355,00	355,20	361,20	386,00	389,70	392,50
371,00	396,00	381,40	389,20	395,00	399,20	400,20	419,50	433,70
272,60	284,60	299,50	319,70	328,90	340,00	352,30	365,50	377,00
268,70	279,50	300,00	314,90	337,00	350,10	369,40	394,20	399,70
259,60	280,30	299,40	322,10	339,50	349,90	357,20	361,50	379,40
271,20	287,40	302,70	319,50	333,10	345,70	354,60	368,50	380,20
272,80	295,20	307,40	315,30	328,00	333,90	349,20	363,00	383,30
270,00	287,40	307,50	315,80	330,20	342,70	359,40	362,00	379,40
290,00	307,50	316,00	326,00	345,40	362,10	371,00	387,40	409,00
299,10	318,40	339,20	359,60	369,70	387,90	392,50	401,00	419,80
284,60	308,70	328,70	354,40	372,90	385,90	400,00	418,70	432,80
269,00	278,40	300,00	321,00	345,20	357,70	368,20	374,90	390,00
269,10	274,00	294,70	311,20	324,80	337,00	352,10	361,30	380,00
274,00	287,00	298,40	311,00	325,00	341,40	350,20	364,20	382,00
279,50	295,60	312,00	321,40	332,40	344,70	357,20	366,60	379,00
298,10	310,50	336,70	359,70	365,50	377,60	358,20	368,10	375,00
294,50	319,70	328,90	341,20	350,00	369,40	387,50	397,20	400,10
287,30	295,90	312,40	331,50	342,80	360,00	372,60	385,30	392,00
294,70	302,10	317,50	330,00	357,70	367,30	372,10	382,60	372,80
285,50	297,20	300,90	309,50	321,00	332,70	354,00	376,70	384,00
293,50	308,00	317,50	325,40	337,00	348,90	366,00	374,50	387,20
282,40	293,50	301,00	311,70	324,80	338,50	353,70	368,40	382,70

peso S16	peso S17	peso S18	peso S19	peso S20	peso S21	peso S22	peso S23
495,20	501,30	517,90	531,00	540,00	553,20	560,00	560,00
424,60	450,00	485,10	501,60	523,00	548,00	563,00	563,00
419,00	444,20	491,20	507,50	529,80	546,80	566,00	566,00
483,90	500,00	512,00	527,50	543,60	564,00	581,00	581,00
444,50	475,20	501,30	519,00	530,00	552,10	563,70	563,70
535,30	539,00	550,00	568,30	570,00	573,80	572,90	570,20
449,50	461,20	474,20	492,00	512,00	525,00	537,00	535,00
456,00	480,00	500,00	529,40	542,60	559,00	572,00	568,00
433,00	445,20	468,50	499,40	527,10	536,00	547,50	543,00
413,40	433,30	471,00	500,00	512,80	529,00	553,00	550,00
475,00	491,00	512,80	527,50	553,70	571,20	589,00	588,00
417,70	441,30	479,00	493,70	514,00	530,00	542,00	543,00
449,60	460,30	488,20	499,20	507,50	512,00	525,00	522,00
470,30	499,50	521,00	543,00	552,10	564,00	572,00	570,00
445,10	472,30	497,20	507,40	518,00	533,00	542,90	540,00
495,00	501,90	512,60	533,20	552,00	570,00	591,00	593,40
457,10	478,00	499,50	522,00	530,00	541,20	566,00	570,00
415,70	436,80	455,50	480,00	501,00	511,30	530,00	532,10
397,00	416,90	436,20	471,00	494,70	507,30	529,00	531,70
452,00	465,10	473,80	482,00	493,70	522,00	533,00	536,00
385,50	397,10	409,70	416,00	429,20	443,90	456,20	456,20
417,70	437,70	441,50	449,70	453,80	465,50	475,00	475,00
404,30	417,60	438,00	459,50	471,30	481,90	508,70	508,70
406,50	430,50	447,80	460,00	478,50	493,00	507,30	507,30
393,40	411,20	438,40	451,00	467,50	481,40	495,00	495,00
396,00	412,40	422,50	432,10	349,00	465,20	471,70	469,30
425,80	435,00	447,50	461,00	478,90	495,20	510,30	507,20
432,70	443,00	451,90	462,30	478,00	504,00	515,80	511,90
446,70	445,70	462,30	475,00	484,60	499,50	505,30	502,40
401,20	412,50	432,00	444,10	457,80	465,00	475,50	470,30
392,90	408,00	412,90	420,00	435,00	443,00	459,50	470,00
401,60	395,00	402,50	417,90	427,10	441,00	452,00	453,00
384,20	395,40	403,40	416,30	429,80	440,00	459,90	460,00
396,40	393,00	415,40	429,50	441,20	445,20	456,90	463,70
413,60	429,00	439,40	448,60	465,10	477,50	486,50	487,30
405,70	422,00	429,00	435,20	446,20	451,70	460,40	465,00
382,60	402,10	415,00	421,80	432,40	443,00	452,00	455,10
395,60	401,30	412,00	425,50	436,60	443,50	454,80	458,70
391,00	399,00	406,80	421,70	439,80	443,50	450,00	454,70
401,20	427,60	323,10	447,50	457,30	465,20	472,00	475,00

Tabela 14- Médias de consumo de ração por animal/dia.

grupos	tempo sac.	ração S1	ração S2	ração S3	ração S4	ração S5	ração S6	ração S7
Controle	24 horas	20,84	27,57	27,02	26,66	29,20	28,46	30,54
	48 horas	20,32	26,39	26,45	27,17	25,71	28,73	26,56
	72 horas	19,83	26,74	25,54	25,61	28,89	28,24	27,96
	240 horas	19,76	25,88	25,88	26,86	27,30	27,36	26,61
Tratado	24 horas	18,88	17,68	15,54	16,57	16,80	17,36	17,46
	48 horas	17,62	17,38	15,70	16,23	17,94	18,08	17,23
	72 horas	18,60	18,28	15,53	15,78	18,02	18,13	19,44
	240 horas	18,97	20,65	17,80	17,54	18,50	18,30	19,93

ração S8	ração S9	ração S10	ração S11	ração S12	ração S13	ração S14	ração S15	ração S16
27,00	28,23	26,92	27,41	27,63	27,67	28,71	24,40	25,54
26,86	26,81	26,19	26,51	25,65	27,41	26,21	25,37	24,83
27,85	27,31	26,94	27,78	25,78	27,56	26,34	24,43	23,70
26,17	26,94	26,30	26,74	26,77	26,67	25,14	25,17	25,33
16,48	17,15	16,98	17,82	17,90	16,28	17,92	17,93	19,11
17,05	17,72	16,94	18,12	17,64	17,39	18,62	18,03	18,61
16,36	17,69	18,08	18,36	17,90	16,92	19,02	16,46	19,06
16,36	17,57	17,81	17,60	18,40	17,64	18,00	19,11	17,88

ração S17	ração S18	ração S19	ração S20	ração S21	ração S22	ração S23	ração S24	ração S25
22,94	23,41	26,92	27,67	27,32	28,23	25,79	27,12	26,98
25,71	26,51	26,81	26,34	26,89	25,37	26,83	26,34	25,71
24,29	27,31	27,67	26,94	25,63	26,94	25,94	26,64	24,29
25,11	26,77	26,74	26,17	26,77	26,30	26,78	26,71	25,11
17,61	17,90	18,18	18,48	19,26	19,74	18,04	17,88	18,19
17,77	17,39	17,50	17,00	16,90	18,48	17,89	17,05	16,91
18,23	17,71	17,80	18,42	19,27	19,10	17,88	19,77	17,71
18,67	18,33	18,23	18,71	20,00	20,47	19,42	18,72	18,24

ração S26	ração S27	ração S28	ração S29	ração S30	ração S31	ração S32	ração S33	ração S34
27,32	27,00	28,63	29,20	26,74	26,94	26,92	27,00	28,84
26,89	26,94	25,71	26,11	26,98	26,17	26,81	26,86	26,94
26,30	26,17	27,00	28,89	28,00	26,69	27,67	26,81	27,32
26,77	26,11	26,86	27,30	27,12	25,53	26,74	27,67	26,98
17,90	18,02	17,90	16,98	17,60	17,90	17,51	17,62	16,46
18,49	19,07	18,39	18,62	18,20	17,78	18,00	19,45	17,78
19,28	18,24	17,43	18,02	18,99	18,43	17,62	18,04	16,91
18,71	19,19	19,11	19,45	18,39	18,24	19,68	17,89	17,71

ração S35	ração S36	ração S37	ração S38	ração S39	ração S40	ração S41	ração S42	ração S43
26,94	27,00	26,89	27,32	27,32	26,92	28,23	26,94	26,81
26,81	26,71	26,94	28,89	25,84	27,13	25,37	26,17	27,67
27,67	26,97	27,12	25,83	26,94	28,00	26,94	27,11	26,63
27,32	26,17	26,42	27,71	26,17	27,71	26,30	26,11	25,84
16,94	17,62	18,61	16,91	17,50	18,00	16,46	18,04	17,23
18,21	17,92	18,04	17,71	17,62	17,25	16,91	17,89	16,85
17,62	18,23	17,89	17,78	19,45	18,61	17,71	17,50	18,02
17,50	19,45	18,23	16,47	17,98	18,61	17,62	17,78	17,95

Média grupo controle = 26,59

Média grupo tratado = 17,59

Tabela 15- Médias de consumo de líquido por animal/dia.

grupos	tempo sac.	H2O S1	H2O S2	H2O S3	H2O S4	H2O S5	H2O S6	H2O S7
Controle	24 horas	24,50	30,83	42,00	40,83	44,33	40,00	40,33
	48 horas	25,50	30,83	42,33	41,83	45,00	41,67	41,33
	72 horas	25,67	30,33	40,83	42,17	46,33	43,50	41,33
	240 horas	25,50	30,67	42,33	42,50	46,67	43,00	45,33
Tratado	24 horas	26,14	17,00	15,28	18,28	21,85	18,00	17,42
	48 horas	26,00	19,00	16,42	20,28	23,00	19,00	18,28
	72 horas	27,14	18,85	13,14	16,71	22,42	18,57	18,57
	240 horas	27,14	20,28	16,42	18,57	21,42	19,28	17,42

H2O S8	H2O S9	H2O S10	H2O S11	H2O S12	H2O S13	H2O S14	H2O S15	H2O S16
41,67	42,67	42,50	39,17	36,17	41,17	45,67	45,17	41,33
38,17	40,33	41,67	43,00	41,33	40,67	44,17	44,33	39,33
42,67	41,67	45,00	41,50	45,83	42,00	44,00	45,33	35,00
41,33	43,33	41,83	41,67	41,00	45,83	46,17	47,67	44,33
17,57	18,85	19,14	23,28	20,14	17,28	18,23	18,57	19,00
20,42	20,57	20,00	20,85	19,00	18,57	18,54	19,71	18,57
18,85	19,28	21,28	19,14	18,00	16,28	16,98	17,85	17,42
18,28	20,85	19,85	20,28	17,85	18,00	18,67	20,00	18,85

H2O S17	H2O S18	H2O S19	H2O S20	H2O S21	H2O S22	H2O S23	H2O S24	H2O S25
35,43	35,94	36,17	41,83	42,64	39,33	40,33	39,94	42,17
35,43	35,21	41,33	42,50	41,63	38,00	41,67	40,67	42,50
34,86	36,02	39,45	41,67	44,33	41,64	39,17	40,08	39,33
39,14	38,03	41,35	45,00	42,69	42,34	41,33	41,00	39,64
19,42	20,28	20,71	18,57	19,00	20,28	20,28	19,42	19,98
20,28	20,71	20,28	17,85	16,71	19,14	21,57	22,85	17,68
19,42	20,00	19,28	19,28	18,28	18,71	20,28	17,14	19,26
22,00	20,42	20,28	19,14	21,42	21,42	24,28	20,57	19,14

H2O S26	H2O S27	H2O S28	H2O S29	H2O S30	H2O S31	H2O S32	H2O S33	H2O S34
42,64	41,26	39,64	42,39	41,83	40,33	42,67	40,39	41,28
44,02	40,97	41,33	42,67	42,50	41,67	42,17	41,12	42,67
41,12	41,03	42,17	44,33	41,67	42,67	42,50	39,33	40,67
42,03	40,64	42,50	44,33	45,00	44,33	41,83	39,00	39,04
18,98	18,00	17,98	19,67	17,14	19,64	18,14	16,19	20,28
19,33	17,98	18,21	20,03	22,14	19,21	18,86	20,12	19,42
17,00	17,36	19,02	21,03	18,57	17,93	19,14	20,03	18,51
19,45	18,00	18,03	19,89	17,14	19,64	20,00	19,84	17,85

H2O S35	H2O S36	H2O S37	H2O S38	H2O S39	H2O S40	H2O S41	H2O S42	H2O S43
42,50	41,83	42,13	42,98	43,64	41,64	40,36	41,36	41,64
41,67	41,67	41,98	41,67	42,21	40,12	39,67	39,98	42,34
45,00	42,67	39,68	44,00	42,24	42,98	41,33	42,04	42,17
41,34	42,34	41,23	42,39	40,96	42,82	41,83	41,94	42,50
18,14	20,28	19,67	19,04	19,71	19,67	19,23	19,72	17,85
17,85	19,42	19,00	18,67	19,28	18,64	17,85	18,98	19,28
19,28	19,71	18,96	17,85	19,14	19,71	18,14	20,28	19,14
19,14	18,98	19,04	19,71	18,14	19,67	19,34	19,42	19,70

Média grupo controle = 41,03

Média grupo tratado = 19,31

Tabela 16- Médias de kcal totais ingeridas por animal/dia.

Grupos	tempo sac.	Kcal S1	Kcal S2	Kcal S3	Kcal S4	Kcal S5	Kcal S6	Kcal S7
Controle	24 horas	56,26	74,43	72,95	71,98	78,84	76,84	82,45
	48 horas	54,86	71,25	71,41	73,35	69,41	77,57	71,71
	72 horas	53,54	72,19	68,95	69,14	78,00	76,24	75,49
	240 horas	53,35	69,87	69,87	72,52	73,71	73,87	71,84
Tratado	24 horas	87,57	71,53	63,35	70,33	75,95	72,07	71,53
	48 horas	83,97	73,52	65,37	72,21	80,63	75,41	72,11
	72 horas	88,21	75,74	60,32	66,00	80,04	74,94	78,48
	240 horas	89,21	84,14	71,04	73,35	79,93	76,40	78,19

Kcal S8	Kcal S9	Kcal S10	Kcal S11	Kcal S12	Kcal S13	Kcal S14	Kcal S15	Kcal S16
72,90	76,22	72,68	74,00	74,60	74,70	77,51	65,88	68,95
72,52	72,38	70,71	71,57	69,25	74,00	70,76	68,49	67,04
75,19	73,73	72,73	75,00	69,60	74,41	71,11	65,96	63,99
70,65	72,73	71,01	72,19	72,27	72,00	67,87	67,95	68,39
69,09	72,69	72,64	80,70	76,52	68,14	73,90	74,40	78,19
74,62	76,64	73,73	78,11	74,22	72,95	76,23	76,27	76,24
70,56	74,75	78,60	76,36	73,53	68,47	75,12	69,43	75,85
69,76	76,62	75,87	75,91	74,67	72,82	74,73	79,59	74,66

Kcal S17	Kcal S18	Kcal S19	Kcal S20	Kcal S21	Kcal S22	Kcal S23	Kcal S24	Kcal S25
61,93	63,20	72,68	74,70	73,76	76,22	69,63	73,22	72,84
69,41	71,57	72,38	71,11	72,60	68,49	72,44	71,11	69,41
65,58	73,73	74,70	72,73	69,20	72,73	70,03	71,92	65,58
67,79	72,27	72,19	70,65	72,27	71,01	72,30	72,11	67,79
74,73	76,72	78,08	75,89	78,60	81,69	77,10	75,46	77,08
76,37	75,94	75,64	70,80	69,02	76,69	78,50	78,02	70,40
76,40	75,81	75,05	76,72	77,62	77,76	76,66	77,37	74,78
81,20	78,07	77,61	77,31	83,98	85,25	86,42	79,34	76,04

Kcal S26	Kcal S27	Kcal S28	Kcal S29	Kcal S30	Kcal S31	Kcal S32	Kcal S33	Kcal S34
73,76	72,90	77,30	78,84	72,19	72,73	72,68	72,90	77,86
72,60	72,73	69,41	70,49	72,84	70,65	72,38	72,52	72,73
71,01	70,65	72,90	78,00	75,60	72,06	74,70	72,38	73,76
72,27	70,49	72,52	73,71	73,22	68,93	72,19	74,70	72,84
74,90	73,85	73,50	73,38	71,51	75,82	72,67	70,24	72,83
76,98	76,66	75,14	78,31	80,13	74,90	75,00	80,68	75,19
75,85	73,55	73,68	78,09	77,26	74,86	74,37	76,75	71,57
77,74	77,01	76,83	80,36	73,65	76,74	81,13	76,07	72,80

Kcal S35	Kcal S363	Kcal S37	Kcal S38	Kcal S39	Kcal S40	Kcal S41	Kcal S42	Kcal S43
72,73	72,90	72,60	73,76	73,76	72,68	76,22	72,73	72,38
72,38	72,11	72,73	78,00	69,76	73,25	68,49	70,65	74,70
74,70	72,81	73,22	69,74	72,73	75,60	72,73	73,19	71,90
73,76	70,65	71,33	74,81	70,65	74,81	71,01	70,49	69,76
71,13	75,96	77,78	72,31	74,84	76,13	71,36	76,31	71,51
74,15	75,57	75,30	73,95	74,56	72,67	70,64	74,87	72,48
74,56	76,81	74,84	72,99	79,31	77,84	73,21	75,64	75,45
74,04	79,08	75,87	72,05	73,94	77,78	74,65	75,19	76,04

Média grupo controle = 71,80

Média grupo tratado = 75,50

Tabela 17- Médias da origem das kcal ingeridas pelos animais tratados/dia.

	S1	S2	S3	S4	S4	S6	S7	S8
ração	57,32	65,51	67,02	63,33	60,78	64,94	66,58	62,98
álcool	42,68	34,49	32,98	36,67	39,22	35,06	33,42	37,02

S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17
62,97	62,65	62,40	64,89	65,24	66,20	64,44	66,10	63,21
37,03	37,35	37,60	35,11	34,76	33,80	35,56	33,90	36,79

S18	S19	S20	S21	S22	S23	S24	S25	S26
62,82	63,19	65,17	65,86	65,35	62,04	63,90	64,31	65,74
37,18	36,81	34,83	34,14	34,65	37,96	36,10	35,69	34,26

S27	S28	S29	S30	S31	S32	S33	S34	S35
66,83	65,73	63,61	65,30	64,61	64,85	64,89	63,58	64,56
33,17	34,27	36,39	34,70	35,39	35,15	35,11	36,42	35,44

S36	S37	S38	S39	S40	S41	S42	S43
64,30	64,67	63,82	64,72	64,28	63,99	63,66	64,00
35,70	35,33	36,18	35,28	35,72	36,01	36,34	36,00

% ração = 64,2

% álcool = 35,8

Tabela 18- Dados Análises morfométricas (valores absolutos).

grupo	tempo sac.	animal	camadas	total cels	neutrófilo	linfócito	mastócito	outras cels.
controle	24 horas	A	11	204	138	12	2	52
		B	9	199	137	10	1	51
		C	14	187	129	9	0	49
		D	10	201	122	12	0	67
		E	9	196	128	19	1	48
	48 horas	A	13	189	115	56	0	18
		B	12	182	105	51	1	25
		C	15	190	108	55	0	27
		D	13	186	93	50	0	43
		E	11	194	94	53	0	47
	72 horas	A	12	152	64	17	0	71
		B	12	147	79	16	2	50
		C	15	162	72	21	0	69
		D	11	160	78	19	1	62
		E	14	154	64	22	0	68
	240 horas	A	12	89	21	9	0	59
		B	10	100	34	12	0	54
		C	13	91	27	11	0	53
		D	11	95	18	9	0	68
		E	12	87	23	9	0	55
Tratado	24 horas	A	6	154	64	10	2	78
		B	7	162	61	22	0	79
		C	9	147	64	13	3	67
		D	7	149	69	17	2	61
		E	11	150	63	19	0	68
	48 horas	A	8	160	77	23	2	58
		B	9	172	72	25	2	73
		C	7	158	71	29	2	56
		D	9	177	69	31	0	77
		E	9	169	65	27	3	74
	72 horas	A	12	157	77	22	0	58
		B	9	162	62	19	2	79
		C	11	141	63	17	1	60
		D	10	150	69	16	1	64
		E	12	139	59	13	0	67
	240 horas	A	8	80	19	11	0	50
		B	8	74	17	8	1	48
		C	10	72	18	11	1	42
		D	11	69	24	9	0	36
		E	9	67	21	7	0	39

Tabela 19- Dados análises morfométricas (valores em porcentagem).

grupo	tempo sac.	animal	% total cels.	% neutrófilo	% linfócito	% mastócito	% outras cels.
controle	24 horas	A	100,00	67,64	5,88	0,98	25,50
		B	100,00	68,84	5,02	0,50	25,64
		C	100,00	68,98	4,81	0,00	26,21
		D	100,00	60,69	5,97	0,00	33,34
		E	100,00	65,30	9,69	0,51	24,50
	48 horas	A	100,00	60,84	29,62	0,00	9,53
		B	100,00	57,69	28,02	0,54	13,75
		C	100,00	56,84	28,94	0,00	14,22
		D	100,00	50,00	26,88	0,00	23,12
		E	100,00	48,45	27,31	0,00	24,24
	72 horas	A	100,00	42,10	11,18	0,00	46,72
		B	100,00	53,74	10,88	1,30	34,08
		C	100,00	44,44	12,96	0,00	42,60
		D	100,00	48,75	11,87	0,62	38,76
		E	100,00	41,55	14,28	0,00	44,17
	240 horas	A	100,00	23,59	10,11	0,00	66,30
		B	100,00	34,00	12,00	0,00	54,00
		C	100,00	29,67	12,08	0,00	58,25
		D	100,00	18,94	9,47	0,00	71,58
		E	100,00	26,43	10,34	0,00	63,23
Tratado	24 horas	A	100,00	41,55	6,49	1,20	50,76
		B	100,00	37,65	13,58	0,00	48,77
		C	100,00	43,53	8,84	2,00	45,63
		D	100,00	46,30	11,40	1,30	41,00
		E	100,00	42,00	12,66	0,00	45,34
	48 horas	A	100,00	48,12	14,37	1,25	36,26
		B	100,00	41,86	14,53	1,16	42,45
		C	100,00	44,93	18,35	1,26	35,46
		D	100,00	38,98	17,51	0,00	43,51
		E	100,00	38,46	15,97	1,77	43,80
	72 horas	A	100,00	49,04	14,01	0,00	36,95
		B	100,00	38,27	11,72	1,23	48,78
		C	100,00	44,68	12,05	0,70	42,57
		D	100,00	46,00	10,66	0,66	42,68
		E	100,00	42,44	9,35	0,00	48,21
	240 horas	A	100,00	23,75	13,75	0,00	62,50
		B	100,00	22,97	10,81	1,35	64,87
		C	100,00	25,00	15,27	1,38	58,35
		D	100,00	34,78	13,04	0,00	52,18
		E	100,00	31,34	10,44	0,00	58,22

ANEXO 2

Cópias dos certificados da Comissão de ética animal nº 108-1 e 108-2, nas páginas subsequentes.



Comissão de Ética na Experimentação Animal
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
CEEa-IB-UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 108-1, sobre "Os efeitos do consumo crônico de álcool no processo de reparação tecidual da mucosa oral de rato" sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Angelo Camilli está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEa)-IB-UNICAMP em reunião de 11/02/00. Este certificado expira em 11/02/01.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº, about ".....", is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Institute of Biology/UNICAMP Ethical Committee for Animal Research (CEEa) in 11/02/00. Expiration date 11/02/01.

Campinas, 11 de fevereiro de 2000

Albino
Prof(a) Dr(a) Alba R. M. Souza Bente
Presidente - CEEa/IB/UNICAMP

Guilherme Ferreira
Prof(a) Dr(a)
Secretário(a) - CEEa/IB/UNICAMP



**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 108-2, sobre "OS EFEITOS do CONSUMO CRÔNICO de ALCOOL NO PROCESSO de REPARAÇÃO TECIDUAL em MUCOSA ORAL de RATOS."

sob a responsabilidade de CIBELE DOS ANJOS MARCONDES.

..... está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 03/05/01. Este certificado expira em 02/05/02.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº, entitled "

.....", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on 03/ 05/ 01. This certificate expires on 02/05/02.
(d) (m) (y)

Campinas, 03 de maio de 2001.

Profa. Dra. Alba R. M. Souza Brito
Presidente - CEEA/IB/UNICAMP

Prof. Dr. Armando Ferreira Lima
Secretário - CEEA/IB/UNICAMP