

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Felipe Nör

EFEITOS DO ÁLCOOL DURANTE A REGENERAÇÃO DA GLÂNDULA
SUBMANDIBULAR DE RATOS.

Porto Alegre

2010

Felipe Nör

EFEITOS DO ÁLCOOL DURANTE A REGENERAÇÃO DA GLÂNDULA
SUBMANDIBULAR DE RATOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como
requisito para obtenção do grau de Cirurgião-
Dentista pela Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Prof.(a) orientador(a): Dra. Anna Christina Medeiros Fossati

Porto Alegre

2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus. Pela oportunidade da vida dada a cada dia e por ter me dado condições de realizar o curso de Odontologia numa das melhores universidades do país.

Agradeço aos meus pais, Ricardo e Miriam, à minha irmã, Carolina, e à minha dinda Nair Eickstaedt, pela confiança na minha capacidade de realizar o sonho de ser dentista e por todo o apoio, em todos os sentidos, para que esse sonho se tornasse realidade.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Anna Christina Medeiros Fossati que, desde o primeiro semestre da faculdade, me oportunizou o contato com a pesquisa de qualidade e foi responsável pelo meu processo de iniciação científica. A minha vontade de fazer pesquisa sempre esteve alimentada pelo seu exemplo de determinação e sabedoria.

Agradeço à Msc Letícia Westphalen Bento, minha namorada querida, pelo carinho, companheirismo e por toda a ajuda durante a minha caminhada acadêmica e na pesquisa. Sem dúvida, com a tua existência, os momentos difíceis foram mais facilmente enfrentados, e os momentos felizes, muito melhor aproveitados.

Agradeço aos meus colegas da ATO 2010/1, colegas “ótimos”, por sempre estarem dispostos a ajudar, além de tornar o nosso ambiente acadêmico muito mais leve e descontraído.

Agradeço aos colegas de pesquisa e agora cirurgiões-dentistas Peter Robson Slongo, Rafael Lazzaron Lamers, Gerson Acasigua e, especialmente ao meu companheiro de pesquisa, Marcelo Dewes Hartmann, por toda a ajuda desde os primeiros dias no laboratório de Biologia Bucal e no desenvolvimento deste Trabalho de Conclusão de Curso. A ajuda de vocês foi de grande importância para a realização deste trabalho.

Não poderia deixar de citar outras pessoas que, de alguma forma, contribuíram na minha formação em odontologia, compartilhando suas qualidades e experiências: André Sipert, Duarte Silvestre Matzenbacher, Fernando Borba de Araujo, Francesca Bercini, Jacques Eduardo Nör, João Batista Burzlaff, João Krainovic Neto, Pantelis Varvaki Rados.

*A humildade é a base e o
fundamento de todas as virtudes.*

Cervantes

O trabalho de Conclusão de Curso, aqui apresentado, é parte de um trabalho maior do laboratório de Biologia Bucal, da Faculdade de Odontologia da UFRGS. Esse trabalho foi enviado para publicação (01/04/2010) com o título “**Effects of alcohol during the regeneration of submandibular gland**” e foi desenvolvido pelos seguintes autores:

NÖR, F ¹; HARTMANN, MD ¹; PADILHA, DMP ²; FOSSATI, ACM ³.

1. Acadêmico de Odontologia, Departamento de Biologia Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/Brasil.
2. Professor de Gerontologia e Geriatria, Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre/Brasil.
3. Professor de Biologia dos Tecidos Bucais, Departamento de Biologia Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/Brasil.

RESUMO

Objetivo. Esse estudo investigou, microscopicamente, o efeito da ingestão crônica de álcool na regeneração da glândula submandibular de ratos.

Desenho do Estudo. Experimento Randomizado, Cego e Controlado em modelo animal.

Métodos. Doze ratos machos Wistar com 60 dias de idade foram usados neste estudo. O grupo teste recebeu etanol a 40° GL e o grupo controle recebeu água *ad libitum* durante todo o período experimental. Um terço do lobo esquerdo da glândula submandibular foi removido. Três e 7 dias depois, toda a glândula foi excisada e analisada.

Resultados. No grupo teste, aos três dias de regeneração, o processo inflamatório foi mais pronunciado em relação ao grupo controle. O aspecto inverso foi observado no sétimo dia de regeneração, associado com um desenvolvimento avançado do parênquima. Mudança na expressão da laminina foi observada no grupo teste, possivelmente causando um padrão de morfologia avançado durante a regeneração da glândula salivar, provavelmente devido aos efeitos do álcool.

Conclusão. Animais que receberam etanol apresentaram alteração no padrão da regeneração glandular.

Palavras-Chave: glândula submandibular; álcool; laminina.

ABSTRACT

Objective. This study investigated microscopically the effect of chronic alcohol ingestion in submandibular gland regeneration in rats.

Study design. Randomized, Blind and Controlled Experiment in Animal Model

Methods. Twelve 60-day-old male Wistar rats were used in this study. The test group received ethanol 40° GL and the control group received water during the whole experimental period. One third of the left submandibular gland lobe was removed. Three or 7 days after, the whole gland was excised and analyzed.

Results. In test group, the inflammatory process was more pronounced than control group on day three. The inverse aspect was observed on day 7, associated with an advanced parenchyma development. Change in laminin expression was observed in the test group, possibly causing advanced morphogenesis during the salivary gland regeneration, probably due to alcohol effects.

Conclusion. Animals who received ethanol showed alteration in the pattern of glandular regeneration.

Key words: submandibular gland; alcohol; Laminin.

SUMÁRIO

1. Introdução	9
2. Metodologia	10
3. Resultados	12
4. Discussão	13
5. Conclusão	16
6. Referências	17
7. Painéis	20
8. Anexo	25

INTRODUÇÃO

O fluxo adequado de saliva, fator essencial para a saúde bucal e geral, é altamente dependente da integridade da glândula submandibular (GSM). Essa glândula contribui com grande parte da saliva presente na cavidade bucal ¹. A ação de um agente nocivo sobre essa glândula pode levar a uma diminuição no volume e até mesmo na qualidade da saliva produzida, o que torna o meio bucal, bem como o sistema estomatognático, mais suscetível a doenças.

Os efeitos negativos da ingestão de álcool podem ser observados nas glândulas salivares. A ingestão de álcool gera macro e microscópicas alterações morfológicas, manifestadas na composição alterada da saliva e no seu fluxo reduzido, com conseqüências danosas ao organismo ²⁻⁹. A perda de parte da glândula também pode levar a mudanças negativas ^{10,11}. Portanto, a completa regeneração da GSM é essencial para que a glândula retome suas funções normais ¹.

A lâmina basal (LB), estrutura localizada entre as células epiteliais e o tecido conjuntivo, desempenha um papel importante nos processos de regeneração e desenvolvimento de tecidos. A integridade da LB e sua constante renovação, esta última característica podendo ser observada através de corte histológico onde foi realizada a técnica de imunohistoquímica mostrando a disposição das moléculas componentes da LB lhe conferindo um padrão descontínuo e fenestrado, são aspectos importantes na regeneração tecidual após alguma injúria, fornecendo um scaffold ao longo do qual as células regeneradoras podem migrar ^{12,13}.

A laminina (LN) é uma molécula exclusivamente encontrada na LB, apresentando diversas isoformas. A laminina contém uma série de sítios biologicamente ativos, envolvidos no crescimento celular, ligação, diferenciação e expressão gênica ¹²⁻¹⁵. Estando a LN envolvida em diversos processos biológicos, a ligação do álcool à laminina pode resultar em alterações estruturais e funcionais no comportamento celular ¹⁶.

Portanto, o foco do presente estudo foi investigar as mudanças ocorridas no processo regenerativo da GSM em animais cronicamente expostos ao etanol 40° GL e que tiveram parte da glândula salivar cirurgicamente removida.

METODOLOGIA

Neste estudo, a graduação alcoólica de 40° GL foi escolhida em função do whisky e da cachaça possuírem semelhante concentração. A investigação foi conduzida através da imunomarcção da LN e provável alteração morfológica glandular¹⁷⁻¹⁹. A fim de observar o aspecto morfológico, as amostras foram coradas com a técnica de hematoxilina e eosina (H/E).

Doze ratos machos Wistar com 60 dias de idade foram usados neste experimento. Cada grupo e período de regeneração foi composto por três animais, totalizando doze ratos (Organograma pág. 20). O reduzido número de animais foi determinação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), o mesmo que aprovou o projeto com o número de protocolo 2005408 (Anexo 1). Entretanto, preocupou-se em manter o padrão de análise em triplicata em todas as amostras e períodos observados.

Os animais foram obtidos de colônias mantidas pelo CREAL (Centro de Reprodução e Experimentação Animal), entidade da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), RS/Brasil. A população animal foi dividida de modo a formar dois grupos, o grupo teste (GT) e o grupo controle (GC). Os animais do GT foram tratados com aumento gradual da concentração de álcool a fim de atingir 40° GL⁵, mantida por 45 dias²⁰. Os animais do GC receberam água *ad libitum* pelo mesmo período. Ração padrão (Nutrival, CR-1, Nutrival Nutrientes, Curitiba, PR/Brasil) foi oferecida a ambos os grupos. Maravalha esterilizada (Vet-Sul, Porto Alegre, RS/Brazil) foi disponibilizada. O experimento foi conduzido sob ventilação apropriada e temperatura variando entre 20-22° C. Os ratos foram expostos a ciclos de 12 h claro/12 h escuro e foram acomodados em gaiolas plásticas esterilizadas (Beira Mar, São Paulo, SP/Brasil) com cobertura de armação metálica (Painel 1).

Decorrido o período de consumo de álcool, os ratos foram anestesiados usando Dopalen® e Rompum® (0.1 ml/100g de peso corporal). O terço inferior do lobo esquerdo da GSM foi excisado, mantendo a integridade do ducto excretor principal da glândula (Painel 2). Durante o período pós-operatório de três e 7 dias, os animais do GT e GC receberam água e alimento *ad libitum*. Aos três e 7 dias pós-excisão, períodos de maiores mudanças no processo regenerativo¹, os animais foram eutanasiados. Procedeu-se, então, à remoção total dos lobos esquerdo e direito da GSM. Todos os espécimes foram fixados em solução de metacarn, processados e embebidos em parafina. Após, foram realizadas secções de 5-µm em um micrótomo rotatório.

Cortes do lobo esquerdo (área de regeneração) e lobo direito (área controle) foram coradas com hematoxilina e eosina (H/E) para a inspeção morfológica. A reação de imunohistoquímica foi realizada para revelar a expressão de LN.

Para a realização da reação da imunohistoquímica da Peroxidase, os cortes foram desparafinizados e re-hidratados em alcoóis graduados, sendo a atividade da peroxidase endógena bloqueada usando 30 vol H₂O₂ e metanol (1:1) por 10 minutos. Soro normal do anticorpo secundário do hospedeiro foi utilizado para bloquear sítios inespecíficos. Anticorpos policlonais primários foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis/USA). O anticorpo usado para LN reconhece diversas isoformas da proteína. Todos os cortes foram incubados overnight em câmara úmida à 4° C, estando o anticorpo primário, Anti-Pan-Laminina obtido de coelho, diluído em 1:100 (PB + 0.2% Triton). O anticorpo secundário biotilado obtido de cabra, anti-coelho-IgG, foi incubado por 2 horas em temperatura ambiente, com diluição 1:200. A técnica de avidina-biotina peroxidase foi utilizada, sendo a reação revelada com diaminobenzidina (Sigma). Um controle negativo, que consistiu na omissão do anticorpo primário, e um controle positivo, onde as fibras musculares, vasos e nervos serviram como marcadores, foram incluídos em todas as reações.

As lâminas foram analisadas sob microscopia óptica, utilizando um microscópio Olympus CX, e fotografadas usando uma câmera digital (Sony Cyber-Shot P10, Oklahoma, Japan).

As inspeções foram realizadas por um observador treinado e cego para os grupos em estudo. A análise quantitativa foi realizada através do programa Image J 1.38x e do plug-in Colour Deconvolution, com vetores calibrados. As imagens da reação de imunohistoquímica foram decompostas e convertidas pelo programa. Assim, foi possível calcular a porcentagem média de área marcada pela LN.

RESULTADOS

Através da técnica do H/E, observou-se um maior processo inflamatório na área de regeneração do GT em relação ao GC, ao terceiro dia de processo regenerativo, mostrando uma concentração aparentemente mais elevada de leucócitos. No entanto, a situação se inverteu aos 7 dias de regeneração. Nesse momento, um aspecto morfológico mais semelhante àquele característico da porção preservada da GMS foi observado no GT em comparação ao GC (Painel 3 – A e B).

O padrão de ramificação, característico do desenvolvimento glandular, esteve mais evoluído no GT. Aos 7 dias de regeneração, o aspecto da região que sofreu o trauma cirúrgico estava semelhante àquele da porção preservada da glândula (Painel 3 – B). Por outro lado, o grupo que consumiu água *ad libitum* continuava apresentando rudimentares bulbos glandulares, no mesmo período e região observados.

Ao lado disso, foi possível observar que a porção da glândula salivar do GT, preservada do ato cirúrgico, apresentou ductos granulosos (DG) mais desenvolvidos, em comparação àqueles observados nas glândulas do GC. Os DG são fonte de fatores de crescimento (Painel 3 – C e D).

A imunomarcção da LN (Painel 4 – A e B) se apresentou mais evidente e concentrada ao redor dos ductos e ácinos do GT, em ambos períodos observados (três dias de regeneração: 35,8% / 7 dias de regeneração: 46,2% - porcentagem média de área marcada). Por outro lado, no GC a imunomarcção de LN (Painel 4 – A e B - detalhe) foi dispersa e menos intensa nos mesmos períodos (três dias de regeneração: 25,4% / 7 dias de regeneração: 21,5% - porcentagem média de área marcada).

DISCUSSÃO

Neste estudo, o dano à GSM consistiu na remoção cirúrgica de uma porção do terço inferior do lobo esquerdo. Assim, foi intuito mimetizar situações como trauma à GSM ou remoção de parte de sua estrutura devido à presença de patologias ²¹. Ao mesmo tempo, observamos o comportamento desta glândula na existência do estímulo do álcool durante sua regeneração.

Os grupos foram analisados microscopicamente e os aspectos observados mostraram diferenças tanto na área de regeneração como na porção preservada do ato cirúrgico entre eles, em ambos períodos experimentais (três e 7 dias). A manutenção da administração do álcool após a cirurgia no GT esteve associada com distúrbios letais, levando os animais à morte. Essa consequência foi observada em experimentos similares no nosso laboratório. Portanto, a administração de álcool foi finalizada no período cirúrgico e pós-operatório. Entretanto, a suspensão do álcool no período regenerativo não preveniu a ocorrência de diferenças entre as glândulas do GT e do GC. Quanto ao consumo de líquido no período pré-operatório, os animais do GT ingeriram menor quantidade em relação aos ratos do GC, como esperado. No que diz respeito à alimentação, também foi observado o menor consumo pelos animais do GT, fato que pode ser associado com a ingestão de calorias através do consumo da dieta alcoólica. Embora os animais-teste tenham consumido menos alimento, não acreditamos que tenham desenvolvido um quadro de mal nutrição. A mal nutrição em roedores é diagnosticada pelas seguintes características: disfunção comportamental, perda ou mudanças no pêlo, diarreia e edema, além de perda de peso notável ²². Esses sinais não foram observados nos animais, em qualquer momento do experimento.

Na realidade, estudos anteriores demonstraram que o consumo crônico de álcool leva a alterações na resposta imune, esse fato sendo associado com a incidência de numerosas patologias ²³.

Com relação ao processo inflamatório observado nos primeiros momentos do processo regenerativo do GT, este fato pode ser consequência do ato cirurgia em si, associado ao consumo do álcool. Nessa mesma linha de pensamento, estudos realizados em voluntários demonstraram que os metabólitos tóxicos derivados do consumo crônico de etanol causaram intenso estresse oxidativo no pâncreas. Essa situação conduz a uma autodigestão das células acinares, com a consequente necrose celular e secreção de mediadores químicos, que, por sua vez, promovem o recrutamento e ativação de células inflamatórias. Desse modo, a expressão

de citocinas normais do processo inflamatório pode ser maior, fato que promove a exacerbação da quimiotaxia de leucócitos, levando a um panorama clínico de inflamação do órgão²⁴. Portanto, podemos sugerir que o mesmo fenômeno ocorreu nos períodos iniciais da regeneração glandular.

Entretanto, devido ao curto tempo de observação (três e 7 dias) e às limitações deste estudo, não foi possível estabelecer uma relação direta entre as manifestações na GSM e o consumo do álcool. Mesmo assim, foi possível observar diferenças no padrão morfológico entre o GT e GC, na região onde ocorreu o ato cirúrgico.

O aspecto apresentado no Painel 3 – B chamou a atenção quando se considera a menor ingestão alimento e líquido pelo GT, sugerindo que os metabólitos do álcool, de alguma forma, influenciaram o processo regenerativo. Importante salientar que ambos os grupos foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico e ambos sofreram processo regenerativo. Similarmente aos nossos resultados, outro grupo de pesquisadores observou que o consumo crônico de álcool causou uma hiper-regeneração em mucosa colo retal. Possíveis mecanismos moleculares podem envolver os efeitos do acetaldeído e/ou dos radicais livres gerados durante o metabolismo do álcool^{3,4}. De modo semelhante, Carrard *et al.*⁵ mostraram que a ingestão de 40% de álcool aumentou a proliferação de células epiteliais na superfície dorsal da mucosa lingual de ratos. Como consequência dessas observações, é possível sugerir que as citocinas inflamatórias influenciam o processo regenerativo da GSM de ratos através de mecanismos moleculares, promovendo o aumento da proliferação epitelial, o que pode resultar no aspecto morfológico observado nas lâminas coradas com H/E.

Pode-se sugerir que as mudanças evidentes de fluxo salivar em indivíduos que habitualmente consomem álcool também podem estar ligadas às mudanças morfológicas observadas na GSM do GT.

O aspecto descontínuo da LN mostrado no Painel 4 (A e B - detalhe) provavelmente representa a renovação da LB requerida para o desenvolvimento das novas estruturas glandulares. Por outro lado, no GT a mesma proteína se apresentou homogênea e concentrada na LB (Painel 4 – A e B). Esse fato abre a discussão para duas hipóteses: (i) a renovação da proteína pode ter ocorrido em períodos não investigados, ou (ii) o álcool e compostos derivados podem ter prejudicado a renovação normal. Neste cenário, um estudo²⁵ com hepatócitos de rato mostrou que a ingestão crônica de álcool comprometeu a ligação célula-LN, devido à diminuição da afinidade entre o receptor celular e a proteína e também devido ao fato desses receptores serem diferentemente afetados pelo álcool. É possível que estas mudanças na adesão celular possam ser resultado da concentração da LN na LB das células no

GT. Esses fatores podem ter levado a uma sinalização incorreta da mitose celular, provocando um processo regenerativo avançado do órgão^{3,4}.

Constrastando com a morfodiferenciação observada no GT, a área de regeneração da glândula apresentou um atraso na síntese de Mucinas Neutras (MN) pelas estruturas glandulares recém formadas, sendo as mucinas evidenciadas pela reação histoquímica do Ácido Periódico de Schiff (PAS). Conseqüentemente, as células glandulares não foram completamente diferenciadas, uma vez que a síntese de MN corresponde ao fluxo salivar primário. A ação antibacteriana das mucinas auxilia na regulação da flora bucal e, assim, promove a interação entre leucócitos e bactérias. As mucinas também são responsáveis pela viscosidade e adesividade da saliva^{26,27}. O álcool ou compostos derivados podem ter determinado uma mudança no padrão da mucina secretada, o que pode ter definido a variação da apresentação das mucinas na coloração do PAS. Esse fato pode ter relação com a propensão para as mudanças salivares em indivíduos que ingerem álcool regularmente. Ainda, alterações na composição de mucinas também foram observadas durante o desenvolvimento normal das glândulas parótidas de ratos e camundongos^{28,29}. (Dados que compõe este presente trabalho, porém não mostrados).

CONCLUSÃO

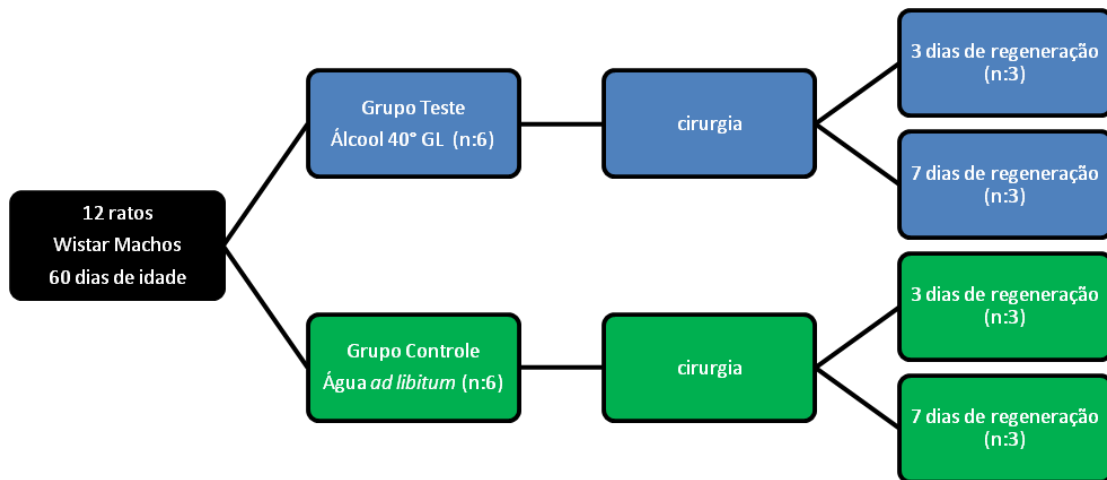
Tomados em conjunto, os dados obtidos nesse estudo sugerem que o álcool alterou a expressão de LN, nos estágios iniciais da regeneração. A laminina é uma proteína essencial para o normal desenvolvimento da glândula salivar, bem como no processo regenerativo. Os resultados sugerem que a alteração da LN provavelmente refletiu no processo morfogênico, acelerando o aspecto de “estrutura de árvore”, característico da glândula salivar. No entanto, mais estudos são necessários para que estas observações possam ser extrapoladas ao cuidado clínico diário do paciente.

REFERÊNCIAS

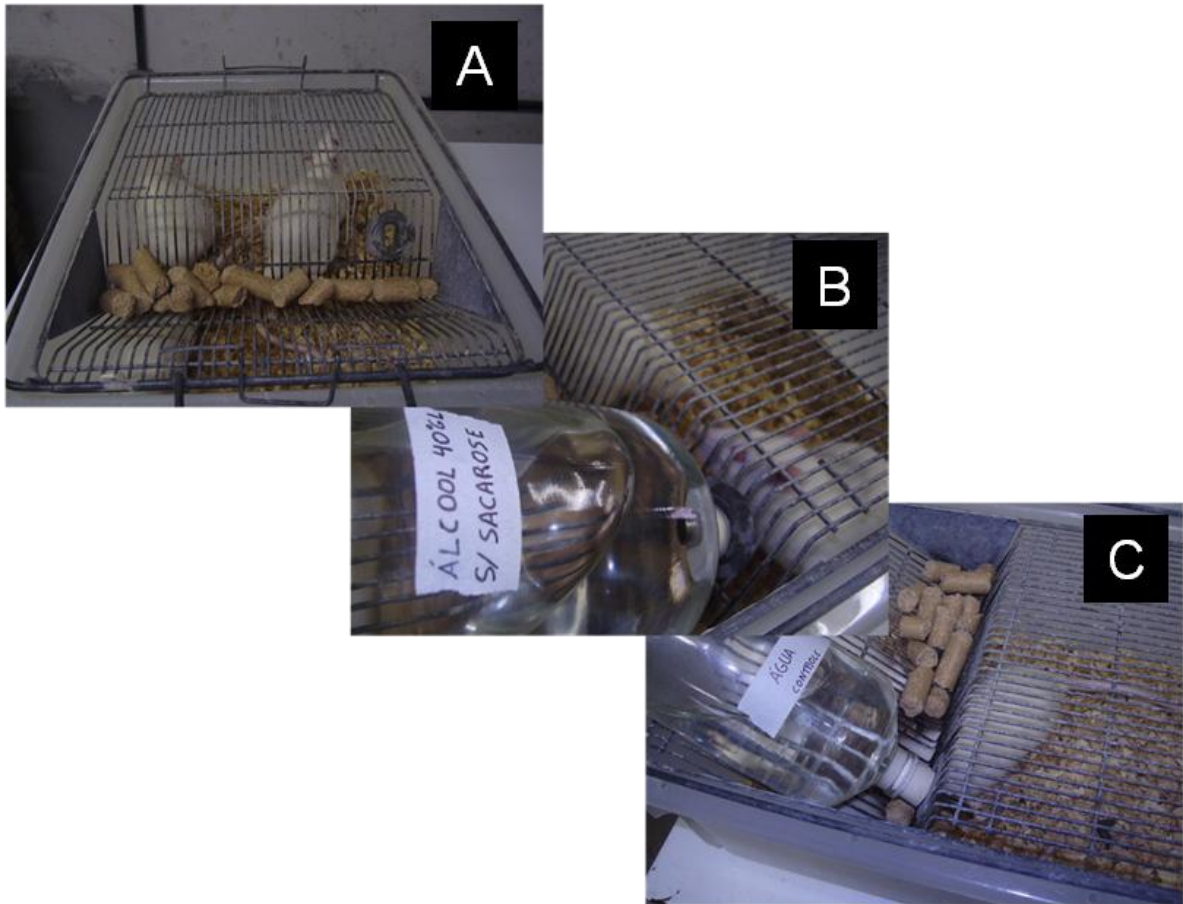
1. Fossati ACM. Estudo da morfo e citodiferenciação da glândula submandibular remanescente de ratos após excisão parcial de um de seus lobos. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 2004;70:323-329.
2. WHO. *Global status report on alcohol.* Geneva: Marketing and Dissemination, World Health Organization, 2004:94.
3. Simanowski UA, Homann N, Knuhl Met al. Increased rectal cell proliferation following alcohol abuse. *Gut* 2001;49:418-422.
4. Vincon P, Wunderer J, Simanowski UAet al. Inhibition of alcohol-associated colonic hyperregeneration by alpha-tocopherol in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 2003;27:100-106.
5. Carrard VC, Filho MS, Rados PV, Chaves AC, Lauxen Ida S. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. *Alcohol* 2004;34:233-238.
6. Scott J, Burns J, Flower EA. Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuse: a necropsy study. *J Clin Pathol* 1988;41:837-840.
7. Mandel L, Wolinsky B, Chalom EC. Treatment of refractory sarcoidal parotid gland swelling in a previously reported unresponsive case. *J Am Dent Assoc* 2005;136:1282-1285.
8. Martin S, Pangborn RM. Taste interaction of ethyl alcohol with sweet, salty, sour and bitter compounds. *J Sci Food Agric* 1970;21:653-655.
9. Abelson DC, Mandel ID, Karmioli M. Salivary studies in alcoholic cirrhosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976;41:188-192.
10. Cerbasi LL. Spontaneous tissue regeneration of the Stensen duct in dogs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009.

11. Stork K, Hope A, Gunzel T, Jungehulsing M. Removal of Wharton's duct during submandibular gland excision. *Laryngoscope* 2008;118:810-812.
12. Aumailley M. Structure and supramolecular organization of basement membranes. *Kidney Int Suppl* 1995;49:S4-7.
13. Alberts B, et al. *Molecular Biology of the cell*. Garland, 1994.
14. Aumailley M, Smyth N. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat* 1998;193 (Pt 1):1-21.
15. Rebutini IT, Patel VN, Stewart JSet al. Laminin alpha5 is necessary for submandibular gland epithelial morphogenesis and influences FGFR expression through beta1 integrin signaling. *Dev Biol* 2007;308:15-29.
16. Xu D, Sorrell MF, Casey CA, Clemens DL, Tuma DJ. Long-term ethanol feeding selectively impairs the attachment of rat perivenous hepatocytes to extracellular matrix substrates. *Gastroenterology* 1994;106:473-479.
17. Zhang X, Li J, Liu XY, Sun YL, Zhang CM, Wang SL. Morphological characteristics of submandibular glands of miniature pig. *Chin Med J (Engl)* 2005;118:1368-1373.
18. Shimano J. A carbohydrate histochemical study of the growth of rat parotid glandular cells. *Aichi Gakuin Daigaku Shigakkai Shi* 1990;28:547-571.
19. Becerra L, Soares RV, Bruno LSet al. Patterns of secretion of mucins and non-mucin glycoproteins in human submandibular/sublingual secretion. *Arch Oral Biol* 2003;48:147-154.
20. Amenabar J. Análise Morfológica das Glândulas Submandibulares de camundongos velhos submetidos ao consumo do vinho tinto e sulfato de atropina. Porto Alegre, BR: PUCRS, 2002.
21. Gurney TA, Eisele DW, Weinberg V, Shin E, Lee N. Adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands treated with surgery and radiation. *Laryngoscope* 2005;115:1278-1282.
22. Campana AO, Burini RC, Outa AY, De Camargo JL. Experimental protein deficiency in adult rats. *Rev Bras Pesqui Med Biol* 1975;8:221-226.

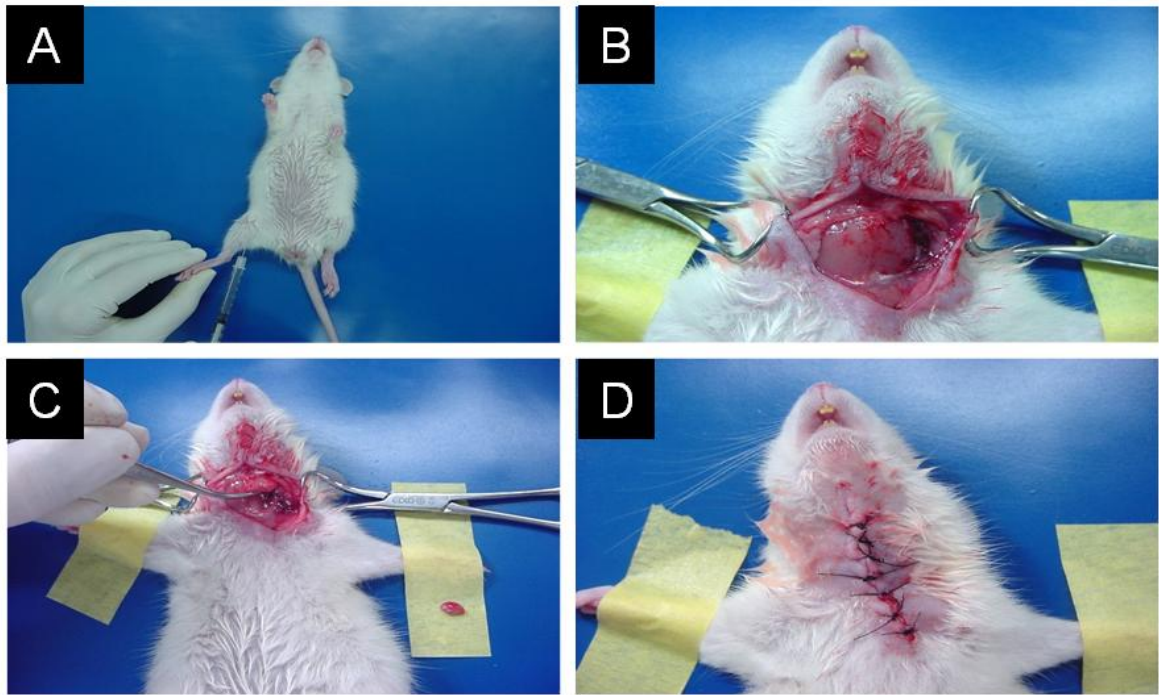
23. Organization WH. *Global status report on alcohol*. Geneva: Marketing and Dissemination, World Health Organization, 2004:94.
24. Szabo G, Mandrekar P, Oak S, Mayerle J. Effect of ethanol on inflammatory responses. Implications for pancreatitis. *Pancreatology* 2007;7:115-123.
25. Xu D, Sorrell MF, Clemens DL, Casey CA, Tuma DJ. Effects of ethanol feeding on the interaction of rat hepatocytes with laminin peptides. *Alcohol Clin Exp Res* 1994;18:1215-1219.
26. Tabak LA, Levine MJ, Mandel ID, Ellison SA. Role of salivary mucins in the protection of the oral cavity. *J Oral Pathol* 1982;11:1-17.
27. Thomsson KA, Schulz BL, Packer NH, Karlsson NG. MUC5B glycosylation in human saliva reflects blood group and secretor status. *Glycobiology* 2005;15:791-804.
28. Ikeda R, Aiyama S. Developmental changes in mucous cells of the early postnatal rat parotid gland: an ultrastructural and histochemical study. *Arch Histol Cytol* 1997;60:185-193.
29. Takada K, Aiyama S, Ikeda R. Morphological and histochemical changes in the secretory granules of mucous cells in the early postnatal mouse parotid gland. *Arch Histol Cytol* 2001;64:259-266.



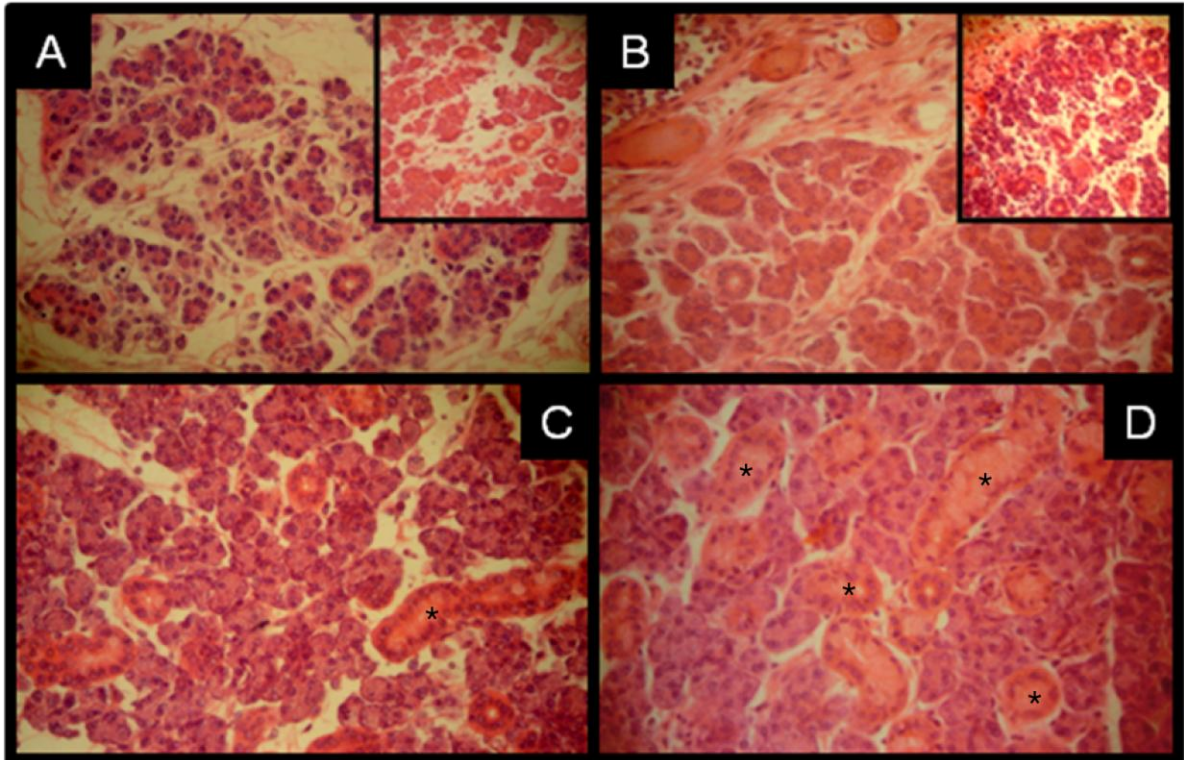
Organograma: esquema da divisão da amostra de animais e sequência metodológica empregada.



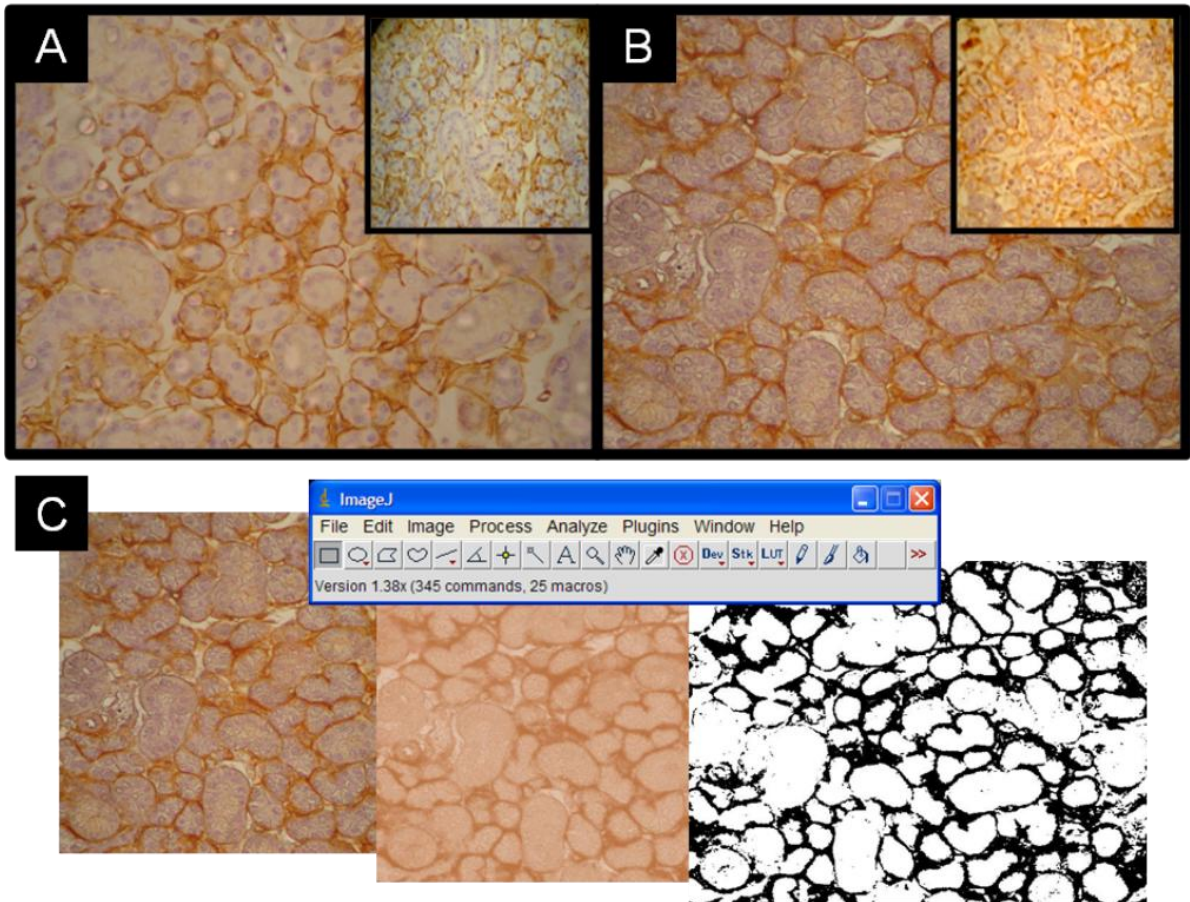
Painel 1 – **A:** Fotografia da gaiola onde os ratos foram mantidos durante o experimento. **B:** Gaiola contendo ratos do GT que receberam a solução de 40⁰ GL sem sacarose durante 45 dias. **C:** Gaiola contendo ratos do GC que receberam água *ad libitum*.



Painel 2 – Esquema de fotos do procedimento cirúrgico de excisão do terço inferior do lobo esquerdo da GSM dos ratos. **A:** procedimento anestésico usando Dopalen® e Rompum® (0.1 ml/100g de peso corporal). **B:** incisão da região do mento até o esterno dos ratos, seguido pela divulsão dos tecidos e exposição da GSM. **C:** isolamento da GSM esquerda e excisão do terço inferior deste lobo. **D:** cuidados com a ferida cirúrgica e sutura a pontos isolados.



Painel 3 – coloração por H/E (aumento de 400x). **A:** aos três dias de regeneração – aspecto morfológico da GSM do rato teste, mostrando maior infiltrado inflamatório, em relação ao aspecto do GC (detalhe), nas regiões envolvidas na cirurgia; **B:** aos 7 dias de regeneração – aspecto morfológico da GSM do rato teste mais característico àquele observado na área preservada do ato cirúrgico em relação ao rato controle (detalhe); no mesmo período, o GC apresentou grande infiltrado inflamatório **C e D:** área da GSM preservada do ato cirúrgico aos 7 dias de regeneração – ductos granulosos (DG *) são mais evidentes no GT (**D**) em relação ao GC (**C**).



Painel 4 – Imunomarcção da LN (aumento de 400x); **A**: aos três dias de regeneração, é mostrada a concentração e a continuidade da LN ao redor de ductos e ácinos da GSM no GT. No GC, no mesmo período, a LN se apresenta descontínua e em menor concentração (**A-detalle**). Aos 7 dias de regeneração, a situação anterior da LN persiste (**B: GT**) (**B-detalle: GC**). **C**: esquema da decomposição da imagem capturada da lâmina onde foi realizada imunohistoquímica para LN pelo programa Image J®, a fim de ser mensurada a porcentagem média de marcação da proteína por área.

ANEXO 1



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO**

pro-pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2005408

Título : EFEITOS DA INGESTÃO CRÔNICA DE ÁLCOOL NA REGENERAÇÃO DA GLÂNDULA SUBMANDIBULAR DE RATOS

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
ANNA CHRISTINA MEDEIROS FOSSATI	PESQ RESPONSÁVEL	annafo@ufrgs.br	33163146
DALVA MARIA PEREIRA PADILHA	PESQUISADOR	dalvapadilha@via-rs.net	33165015
PETER ROBSON SLONGO	PESQUISADOR	peterslongo@yahoo.com.br	
RAFAEL LAZZARON LAMERS	PESQUISADOR	rafalamers@yahoo.com.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 38 , ata nº 59 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quinta-feira, 30 de junho de 2005


 José Roberto Goldim
 Coordenador do CEP-UFRGS