

Ketelin Juliane Dal Prá

**Efeitos da aguardente de cana em glândulas
submandibulares de ratos. Avaliação da
atividade das fosfatases, níveis de mucina e
histomorfometria**

ARAÇATUBA – SP 2016

Ketelin Juliane Dal Prá

**Efeitos da aguardente de cana em glândulas
submandibulares de ratos. Avaliação da
atividade das fosfatases, níveis de mucina e
histomorfometria**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia do Campus de
Araçatuba – Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-
UNESP, para obtenção do Título de
MESTRE EM ODONTOLOGIA (Área
de concentração em Estomatologia)

Orientadora: Prof^a. Adj. Ana Maria Pires Soubhia

ARAÇATUBA – SP 2016

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

D136e Dal Prá, Ketelin Juliane.
Efeitos da aguardente de cana em glândulas submandibulares de ratos. Avaliação da atividade das fosfatases, níveis de mucina e histomorfometria / Ketelin Juliane Dal Prá. - Araçatuba, 2016

54 f. ; il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Ana Maria Pires Soubhia

1. Glândula submandibular 2. Alcoolismo 3. Mucina
4. Fosfatase ácida 5. Fosfatase alcalina I. T

Black D6
CDD 617.63

Dedicatória

Ao meu pai, **Gilmar Dal Prá** por ser o exemplo de determinação, amor e dedicação. Os ensinamentos do passado e do presente me fazem ser quem sou. Agradeço pai por acreditar no meu sonho e por todo sacrifício para fazê-lo se tornar realidade.

A minha mãe, **Sandra Mara S. Dal Prá** (*in Memoriam*), por ser a minha maior inspiração para ser alguém melhor e por todas as lições de vida essenciais para minha formação.

Ao meu noivo **Bruno Magela**, por toda paciência, compreensão e amor. Obrigada por ser meu fiel companheiro nessa jornada e por dar força para continuar nos momentos mais difíceis. Sem teu apoio e lealdade nada disso seria possível. Nunca conseguirei expressar meu real agradecimento e amor por você.

Agradecimentos especiais

A Deus, por Ele me permitir viver esse momento, por iluminar minhas decisões, dar forças nas dificuldades e abençoar meu caminho.

A toda minha família, pai, irmão, sobrinha, tios, primos, e avós que estiveram presentes mesmo com a distância e sempre torceram pelo meu sucesso e felicidade. Obrigada pelo apoio e carinho de todos.

A minha orientadora, Prof^a. Adj. Ana Maria Pires Soubhia, agradeço a oportunidade, o acolhimento, os ensinamentos e estímulos na elaboração do trabalho. Obrigada por acreditar em mim. Admiro seu incansável esforço para atender a tudo e a todos com um sorriso no rosto.

Ao Professor Assistente Doutor Antonio Hernandes Chaves Neto, que tão generosamente me recebeu em seu laboratório, obrigada pela paciência, disponibilidade, por todo conhecimento transmitido e pela imensa participação neste estudo.

Agradecimentos

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, na pessoa do atual diretor Prof. Titular Wilson Roberto Poi, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Ao Professor Titular Glauco Issamu Miyahara, por toda dedicação quanto docente e coordenador da Pós-Graduação da área de Estomatologia. Obrigada pelo amparo, incentivo e apoio em todos os momentos.

Ao Professor Assistente Doutor Eder Ricardo Biasoli, pela oportunidade e confiança depositada na minha pessoa, por toda experiência transmitida durante as clínicas de estomatologia e pela amizade.

Aos demais professores do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Prof. Dr. Antonio Augusto Ferreira de Carvalho, Profa. Dra. Cristiane Furuse, Prof. Dr. Daniel Galera Bernabé, Profa. Dra. Leda Maria Pescinini Salzedas, Profa. Dra Renata Callestini, Prof. Dr. Marcelo Macedo Crivelini, obrigada por todo aprendizado e bom convívio.

À Professora Kellen Tjioe, pessoa essencial para minha formação, agradeço o auxílio na introdução do mundo científico, todos os ensinamentos, dicas e ideias. Obrigada também pela amizade e conselhos nas horas necessárias.

À técnica do Departamento de Patologia e propedêutica Clínica, Giseli Mitsuy Kayahara que foi importantíssima na elaboração do trabalho, esteve em todas as etapas me auxiliando e direcionando, uma profissional competente e essencial.

À amiga Mayra Frasson Paiva, pessoa especial que tenho convivido desde a graduação e com quem planejei a vinda para o mestrado, hoje compartilhamos do mesmo sonho. Obrigada por estar presente em todos esses momentos e por sempre me levantar nas horas difíceis.

À amiga Aneliza Moraes da Silva, por ser exemplo de generosidade ao compartilhar sua pesquisa. Agradeço as risadas, o companheirismo e ajuda nas mais diversas etapas durante o mestrado.

Aos amigos e mestrandos Ingrid Silva e Saygo Tomo, pelo exemplo de dedicação a pesquisa. Agradeço por tornarem vários momentos mais leves e felizes nessa trajetória.

Aos demais colegas da pós-graduação da área de Estomatologia, Bruna, Dani, Flávia, Jéssica, Lígia e Vitor, sou grata aos bons momentos compartilhados e os ruins também, aprendi algo com cada um de vocês.

Aos amigos e profissionais do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Adriana Rahal Leal, José Marcelo Tramarim, Marli Barbosa dos Santos, agradeço por toda ajuda, respeito e amizade.

Aos colegas do laboratório, Wagner e Sidnei, que de várias formas contribuíram valiosamente com este trabalho.

As funcionárias da seção de Pós-Graduação, Cristiane, Lilian e Valéria, pela paciência e disponibilidade em todas as etapas deste processo.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP pela prontidão em nos atender.

À doutoranda Camila Stringhetta pelo auxílio no aprendizado de técnicas.

As alunas de iniciação científica da bioquímica por dividirem seu conhecimento e habilidades.

Ao doutorando Cleidiel Lemos por auxiliar com paciência na elaboração de trabalhos.

Aos Professores Doutores Celso Sonoda, Eduardo Piza Pelizzer e Roberta Okamoto, por terem contribuído com a minha formação.

Aos alunos da graduação, pela convivência e oportunidade em compartilharmos conhecimento e momentos de descontração.

Aos meus amigos de longa data que se mantiveram mesmo com minha ausência e que sempre me alegram.

As demais pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Epígrafe

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”

Cora Coralina

Dal Prá, K.J. Efeitos da aguardente de cana em glândulas submandibulares de ratos. Avaliação da atividade das fosfatases, níveis de mucina e histomorfometria. [Dissertação]. ARAÇATUBA: UNESP – Univ. Estadual Paulista. 2016

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo investigar em glândulas submandibulares de ratos tratados com aguardente de cana, a morfologia, atividade funcional das fosfatases e níveis de mucina. 24 ratos machos e adultos foram divididos em 4 grupos (n=6) de acordo com o tipo de bebida fornecida, aguardente de cana (39° GL) ou água, e ao tempo de tratamento de 75 ou 105 dias. Após os períodos de tratamento, os animais foram submetidos à cirurgia para remoção das glândulas submandibulares, seguido da eutanásia. As glândulas submandibulares do lado direito foram processadas para análise histomorfométrica (Image J) dos ductos estriados, ductos granulosos e ácinos. As glândulas do lado esquerdo foram pesadas e armazenadas a -80 °C, para avaliação da atividade funcional da fosfatase ácida total (FAT), fosfatase ácida resistente ao tartarato (FART), fosfatase alcalina (FAL) e determinação dos níveis de mucina. Para isso foram feitos ensaios bioquímicos por métodos espectrofotométricos. Os dados quantitativos foram submetidos à análise estatística ($p < 0,05$). Os pesos absolutos e relativos das glândulas submandibulares apresentam-se reduzidos em relação aos controles ($p < 0,05$). Na análise histomorfométrica, observamos que houve relevante redução da área dos ácinos ($p < 0,05$) e redução não significativa dos ductos estriados ($p > 0,05$). Nos ductos granulosos ocorreu aumento não significativo da área ($p > 0,05$). As atividades de FAT e FART se apresentaram expressivamente diminuídas nos grupos experimentais ($p < 0,05$), enquanto a atividade funcional de FAL diminuiu de forma moderada ($p > 0,05$). Houve redução significativa dos níveis de mucina pelo efeito do alcoolismo crônico ($p < 0,05$). A partir desses dados foi possível concluir que o alcoolismo crônico, por uso de aguardente de cana afeta a funcionalidade bioquímica e a morfologia da glândula submandibular.

Palavras chave: glândula submandibular, alcoolismo, mucina, fosfatase ácida, fosfatase alcalina

Dal Prá, K.J. Effects of cane brandy on submandibular glands of rats. Evaluation of the activity of phosphatases, mucin levels and histomorphometry. [Dissertation]. Araçatuba: UNESP - São Paulo State University; 2016.

ABSTRACT: The present study aimed to investigate submandibular glands of rats treated with cane brandy, morphology, functional activity of phosphatases and levels of mucin. 24 male and adult rats were divided into 4 groups (n = 6) according to the type of beverage provided, cane brandy (39° GL) or water, and treatment time of 75 or 105 days. After the treatment periods, the animals were submitted to surgery to remove the submandibular glands, followed by euthanasia. The submandibular glands on the right side were processed for histomorphometric analysis (Image J) of the striated ducts, granular ducts and acini. The left glands were weighed and stored at -80 °C for evaluation of the functional activity of total acid phosphatase (TAP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), alkaline phosphatase (ALP), and determination of mucin levels. For this, biochemical tests were carried out by spectrophotometric methods. Quantitative data were submitted to statistical analysis ($p < 0.05$). The absolute and relative weights of the submandibular glands are reduced in relation to the controls ($p < 0.05$). In the histomorphometric analysis, we observed that there was a significant reduction of the acini area ($p < 0.05$) and a non-significant reduction of the striated ducts ($p > 0.05$). In the granular ducts a not significant increase of the area occurred ($p > 0.05$). The TAP and TRAP activities were significantly decreased in the experimental groups ($p < 0.05$), while the ALP functional activity decreased moderately ($p > 0.05$). There was a significant reduction of mucin levels by the effect of chronic alcoholism ($p < 0.05$). From these data it was possible to conclude that chronic alcoholism due to the use of cane brandy affects the biochemical functionality and morphology of the submandibular gland.

Keywords: submandibular gland, alcoholism, mucin, acid phosphatase, alkaline phosphatase.

Lista de figuras

Figura 1 -	Esquema experimental animal.	24
Figura 2 -	Fotomicrografia das análises histomorfométricas do tecido glandular.	33
Figura 3 -	Representação gráfica da porcentagem de área de ductos estriados em glândulas submandibulares.	33
Figura 4 -	Representação gráfica da porcentagem de área de ductos granulosos em glândulas submandibulares.	34
Figura 5 -	Representação gráfica da porcentagem de área de ácinos em glândulas submandibulares	34
Figura 6 -	Efeito do alcoolismo crônico na atividade da FAT nas glândulas submandibulares.	36
Figura 7 -	Efeito do alcoolismo crônico na atividade da FART nas glândulas submandibulares.	36
Figura 8 -	Efeito do alcoolismo crônico na atividade da FAL nas glândulas submandibulares.	37
Figura 9 -	Efeito do alcoolismo crônico sobre os níveis de mucina nas glândulas submandibulares.	38

Lista de tabelas

Tabela 1 –	Peso absoluto e relativo das glândulas submandibulares.	31
------------	---	----

Lista de abreviaturas

FAT	Fosfatase ácida total
FART	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
FAL	Fosfatase alcalina
FOA-UNESP	Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista
GC75	Grupo Controle de 75 dias
GC105	Grupo Controle de 105 dias
GE75	Grupo Experimental de 75 dias
GE105	Grupo Experimental de 105 dias
p-NPP	p-nitrofenilfosfato
p-NP	p-nitrofenil

Sumário

1. Introdução	16
2. Proposição	21
3. Materiais e métodos	23
4. Resultados	31
5. Discussão	40
6. Conclusão	47
7. Referências	49
8. Anexo A - Comitê de Ética	53
Anexo B - Normas do periódico selecionado para envio	54

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O consumo abusivo de bebidas alcoólicas está associado à dependência crônica do álcool e, conseqüentemente, causa vários prejuízos à saúde do indivíduo (1). Segundo a Organização Mundial de Saúde (2), o consumo *per capita* de etanol tem aumentado globalmente e o abuso do álcool tem sido responsável por cerca de 5,9% das mortes em todo o mundo. Os homens utilizam a bebida com mais frequência do que as mulheres e o início do consumo têm ocorrido cada vez mais precocemente. Estudos mencionam que a maioria dos indivíduos introduz o uso de bebidas alcoólicas antes dos 18 anos de idade (3) e 52% dos adolescentes com 12 anos já ficaram embriagados ao menos uma vez (4). No Brasil, o consumo é de aproximadamente 8,7 litros de álcool puro por pessoa a cada ano, 2,5 litros a mais do que a média global de 6,2 litros. Estes dados evidenciam que o brasileiro tem consumido o álcool de forma exagerada e este é um problema de saúde pública (2).

O consumo excessivo de álcool está associado a diversos distúrbios comportamentais, cognitivos e fisiológicos tais como: dependência (5), aumento do risco de câncer de boca, fígado, mama, doença cardíaca coronária (6), danos ao sistema nervoso central e periférico, doenças no fígado, sistema gastrointestinal e reumatológico (7). Investigações também têm demonstrado que o álcool promove efeitos deletérios nas glândulas salivares, porém este é um assunto pouco explorado. (8-10)

Alguns estudos demonstraram mudanças morfológicas e metabólicas nas glândulas submandibulares e parótidas decorrentes do alcoolismo. A principal alteração morfológica relatada foi a atrofia do parênquima glandular,

seja pelo acúmulo de tecido adiposo, (8, 9) ou por redução do estímulo glandular, o dano resulta em uma menor capacidade funcional da glândula (10).

O etanol também parece exercer influência na composição da saliva. Além da redução do fluxo salivar (11-13), foi observada redução da concentração de lactoferrina (14), lisozima (15) e imunoglobulina A (16). Constatou-se também uma redução dos níveis da glicoproteína amilase, sódio, bicarbonato, cloro (17, 18) e das mucinas salivares (19).

As mucinas presentes na saliva são glicoproteínas e possuem características de alta viscosidade, elasticidade e adesividade que são indispensáveis para a manutenção da integridade da membrana mucosa. Controlam a flora bucal devido sua ação antimicrobiana e desempenham um papel importante na lubrificação e proteção dos tecidos bucais duros e moles (20, 21). Pouco se sabe acerca dos efeitos das bebidas alcoólicas sobre as mucinas salivares, sendo necessária a melhor compreensão do assunto.

Os dados acima demonstram que a morfologia das glândulas salivares maiores de animais expostos a bebidas alcoólicas parece estar alterada e conseqüentemente afeta a função e composição da saliva. A verificação da atividade enzimática nestes tecidos submetidos ao tratamento com etanol, ainda não foi investigada e a sua compreensão contribuiria para melhor entendimento dos processos patológicos causados pelo alcoolismo nas glândulas salivares *in vivo* (22).

Enzimas são referidas como catalisadores biológicos, tem ação na regulação do metabolismo celular, modulando, portanto vários processos

celulares, como progressão do ciclo celular, regulação transcricional, crescimento celular, diferenciação e apoptose em variados tecidos (23, 24)

As fosfatases ácidas são uma família de enzimas que pertencem à classe das hidrolases. São especificamente agrupadas em conjunto devido à capacidade partilhada de catalisar a hidrólise de monoésteres de ortofosfato em condições ácidas (25), incluem nesse grupo a fosfatase ácida total (FAT) e outra isoforma chamada fosfatase ácida resistente ao tartarato (FART), caracterizada por ser insensível ao tartarato nas reações catalisadoras e que também tem sua catálise em pH ácido (26, 27). A fosfatase alcalina (FAL) encontra-se em diversas isoformas e apresenta o pH alcalino para a sua catálise (28). É produzida por diversos tecidos, como o osso, fígado, intestino e placenta, e são excretadas pela bile (29).

Inúmeras enzimas foram identificadas na saliva e incluem-se nesse conjunto a FAT, FART e FAL (30). Diversas fosfatases ácidas parecem estar envolvidas nas diferentes fases do círculo secretor das glândulas. A atividade de FAT tem aparecido mais proeminentemente na glândula parótida enquanto a de FART foi mais observada na glândula submandibular (23). A atividade FAL pode ser encontrada em ambas as glândulas salivares (31).

Takuma & Ichida (1993) (32) demonstraram que a inibição das fosfatases do tipo A e 2^a, pelo ácido oadáico potencializa a liberação de alfa-amilase pelas células acinares das glândulas parótidas. Mudanças na atividade da FAT e FAL nas glândulas submandibulares e parótidas também têm sido correlacionadas com hiperglicemia durante o desenvolvimento de diabetes (33) e em glândulas de animais expostos a fumaça de cigarro (34). Estes dados

demonstram que alterações sistêmicas exercem impacto na produção e atividade das fosfatases.

Desta forma, tendo em vista a escassez de trabalhos investigando o impacto da aguardente de cana na morfologia das glândulas salivares e a ausência de investigações sobre o efeito do alcoolismo na atividade bioquímica das glândulas, nos propusemos a contribuir para desvendar este tema ao delinear o presente trabalho.

PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos do alcoolismo crônico em glândulas submandibulares de ratos por meio da análise histomorfométrica dos ácinos, ductos estriados e ductos granulosos, da determinação dos níveis mucina e da atividade funcional das fosfatase ácida total (FAT), fosfatase ácida resistente ao tartarato (FART) e fosfatase alcalina (FAL).

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Este estudo foi desenvolvido mediante a sua aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista (FOA-UNESP), sob o protocolo 00442-2016 (Anexo 1).

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus norvegicus, albinus*) da linhagem Wistar, com 40 dias de idade, provenientes do Biotério da FOA-UNESP, com peso médio de 150 gramas e sem quaisquer doenças. Todos os animais foram mantidos em gaiolas coletivas com 6 animais cada e em ambiente climatizado.

Os ratos foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=6) de acordo com o tipo de bebida recebido e tempo do tratamento (Figura 1). Os animais receberam ração e bebida *ad libitum* durante todo o experimento. A bebida dos grupos controles (GC75 e GC105) era água e a dos grupos experimentais (GE75 e GE105), água que foi sendo substituída gradativamente por aguardente de cana (39° GL) conforme a Figura 1. O modelo de alcoolismo utilizado nos grupos tratados foi o “semi-voluntário” (35).

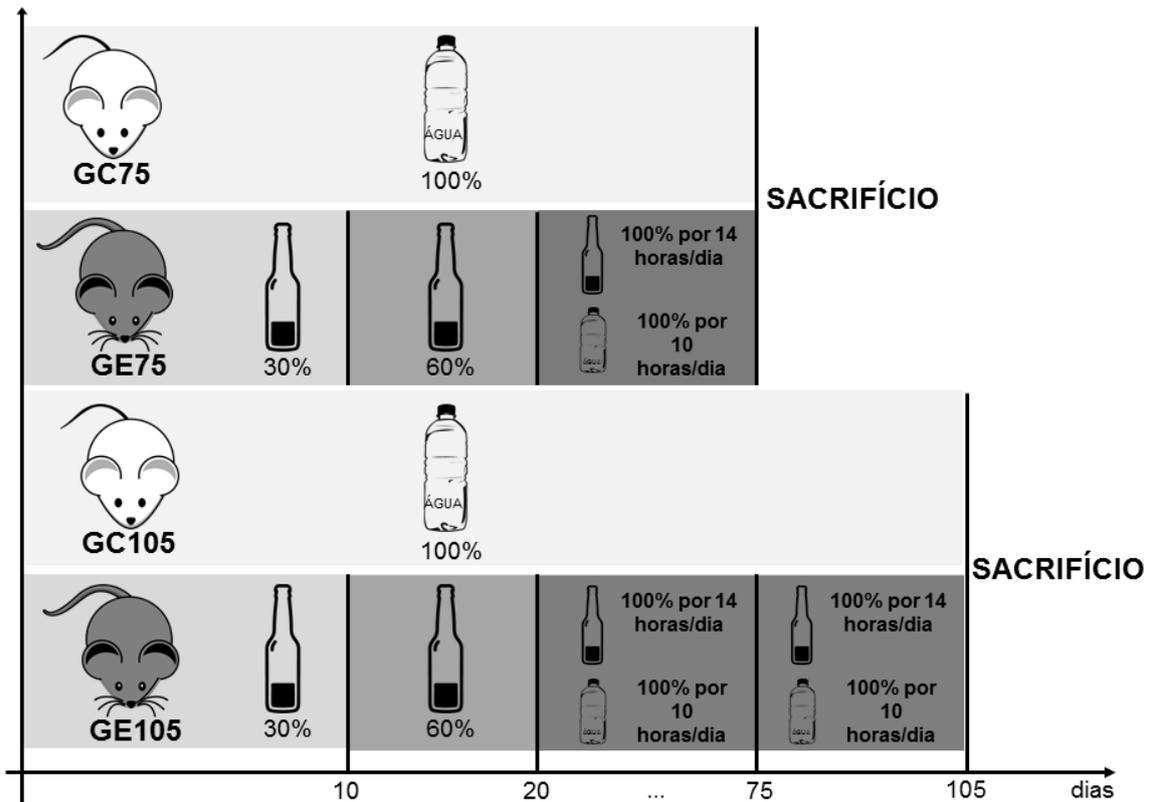


Figura 1- Esquema experimental animal. Os grupos GC75 e GC105 receberam água durante todo o experimento, por 75 e 105 dias respectivamente até o dia da eutanásia. Os Grupos GE75 e GE105 foram induzidos ao alcoolismo crônico de forma gradativa. Durante os 10 primeiros dias receberam 30% de aguardente de cana diluída em água, a partir do 11º dia a concentração de aguardente de cana foi de 60%. Após o 20º passaram a receber 100% da substância alcoólica durante 14 horas ao dia, nas 10 horas restantes receberam água pura até os dias estabelecidos para o sacrifício (75 e 105 dias).

A água e a aguardente de cana foram colocadas em recipientes chamados de “mamadeiras”, onde foi oferecida água, ou a troca gradativa pela substância alcoólica de acordo com os grupos e tempos estabelecidos previamente. A alimentação sólida foi realizada com ração (Presence, Ribeirão Preto SP, Brasil) e repostada 3 vezes por semana. Após os períodos de interesse, os animais foram submetidos a um procedimento cirúrgico para remoção das glândulas salivares submandibulares.

Procedimento Cirúrgico

Nos períodos estabelecidos, os animais foram anestesiados, por meio da administração intraperitoneal, com cloridrato de quetamina (Francotar – Vibrac do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) associado à xilazina (Rompum – Bayer AS – Saúde Animal, São Paulo, Brasil), nas concentrações de 75 mg/kg peso corpóreo e 10 mg/kg de peso corpóreo, respectivamente. Em seguida, as glândulas salivares submandibulares foram acessadas através de incisão longitudinal na região cérvico ventral seguida de incisão transversal até a linha das orelhas, o tecido foi divulsionado até ter acesso as glândulas submandibulares. A glândula sublingual foi separada da submandibular e o excesso de tecido conjuntivo bem como a cápsula das mesmas foram retiradas neste momento. A extirpação das glândulas submandibulares foi realizada com os animais ainda vivos para conservar as enzimas presentes no tecido, após o procedimento foi feita a eutanásia dos animais por meio de dose excessiva de anestésico via intraperitoneal utilizando 3 vezes a dose usada na anestesia geral.

Processamento do material coletado

Todas as glândulas submandibulares coletadas do lado esquerdo foram pesadas para análise de peso absoluto e relativo e posteriormente fracionadas e colocadas em tubos cônicos de 0,5mL de acordo com as análises a serem realizadas. Na sequência, foram congeladas em nitrogênio líquido e conservadas em freezer a -80 °C até o momento das análises. As glândulas submandibulares do lado direito foram processadas no Laboratório

de Patologia do Departamento de Patologia e Propedêutica da FOA-UNESP. As glândulas foram identificadas e, em seguida, fixadas em solução de Helly por 8 horas. Após a fixação, as peças foram seccionadas de acordo com o plano de corte, lavadas em água corrente por 12 horas, processadas para inclusão com desidratação em uma série crescente de álcoois, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina para obtenção de cortes para análise histológicas. As peças receberam cortes de 6 μm de espessura e foram montadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina e eosina.

Análise Histomorfométrica

Esta análise foi realizada com auxílio de microscópio óptico (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland), em aumento de 40X, acoplado a uma câmera de captação de imagem (LeicaR DC 300F microsystems ltd, Heerbrugg, Switzerland) e conectado a um microcomputador com um software analisador de imagens digitalizadas Image J (Software de Processamento e Análise de Imagens, Ontario, Canadá). Foi utilizado um corte histológico de cada glândula submandibular e foram fotografados 2 campos histológicos na região central e 2 campos em região periférica de um lóbulo da glândula. As imagens digitalizadas foram gravadas em arquivos JPEG para serem posteriormente analisadas no programa ImageJ. Foi inicialmente mensurada a área total da glândula em μm^2 e em seguida, através da ferramenta “*free hands*”, foram selecionadas as áreas dos ductos granulosos, ductos estriados e ácinos. A área total da imagem foi quantificada em 100%. Após obter uma média da área dos 4 campos determinados, os valores resultantes foram submetidos a uma regra de três

para calcular a porcentagem de cada estrutura analisada. Os valores de porcentagem obtidos foram registrados em forma de planilha para análise estatística (36).

Análise do perfil de fosfatases ácidas e alcalina das glândulas salivares

Nesta etapa do experimento, parte das glândulas submandibulares foi novamente pesada, tomando-se o cuidado para não descongelarem, homogeneizadas a 10% em solução tampão a 4 °C utilizando um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjen e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos à 4 °C. Para as fosfatases ácidas foi utilizado tampão acetato 100 mM (pH 5,0) e para a fosfatase alcalina, tampão glicina 25 mM (pH 9,4), contendo 2,5 mM de MgCl₂ (Sigma, St. Louis, EUA). A concentração total de proteína no homogenato foi determinada pelo método de Lowry, como descrito previamente (23, 37), usando-se albumina de soro bovino como padrão.

Determinação da atividade das FAT e FART

As análises bioquímicas da FAT e FART nas amostras de homogenato foram realizadas por método colorimétrico modificado adaptado (38, 39). A atividade enzimática da FAT foi determinada à 37° C em tampão acetato de sódio (pH 5,8), contendo 5mM do substrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP, Sigma, St. Louis, EUA), enquanto a atividade da FART foi determinada à 37° C em tampão acetato de sódio (pH 5,8), contendo 5 mM do substrato p-NPP na presença de 50 mM tartarato de sódio e 1 mM p-hidroximercuribenzoato, um inibidor de fosfatases ácidas de baixo peso molecular, (Sigma, St. Louis, EUA). Em todos os ensaios a reação enzimática foi finalizada com a adição de NaOH

1M. A formação de p-nitrofenil (p-NP) foi determinada colorimetricamente pela leitura da absorbância a 405 nm, usando um coeficiente de extinção molar de $18.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. As atividades enzimáticas da FAT e a atividade residual correspondente a FART foram expressas em Unidades Internacionais (U/L), onde uma unidade corresponde a quantidade necessária de enzima que catalisa a transformação de $1 \mu\text{M}$ de substrato por minuto, por litro de amostra.

Determinação da atividade da FAL

A análise bioquímica da FAL nas amostras de homogenato também foi realizada por método colorimétrico modificado adaptado (33). A atividade enzimática foi determinada à $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em tampão glicina 25 mM (pH 9,4), contendo 2,0 mM do substrato p-NPP e 2,5 mM de cloreto de magnésio (Sigma, St. Louis, EUA). A formação de p-NP foi determinada de forma semelhante à FAT e FART, e o mesmo aconteceu para o cálculo da sua atividade enzimática.

Determinação dos níveis de mucina

A determinação dos níveis mucina foi realizada utilizando o método de Azul de Alcian descrito por Hall et al. (1980) (40) e modificado por Sarosiek et al. (1994) (41). Outra fração das glândulas foi homogeneizada com solução 50 mM tampão de acetato de sódio, 25 mM MgCl_2 , pH 5,8, utilizando um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjen e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, foi coletado o sobrenadante para a determinação de mucina e feita a diluição (1:100) e incubação das amostras em uma solução a 1% de Azul de Alcian em 50 mM tampão de acetato de sódio, 25 mM MgCl_2 , pH 5,8 sob agitação constante à temperatura ambiente.

Após incubação, as amostras foram centrifugadas durante 20 minutos a 3000 rpm, os “*pellets*” foram lavados em álcool 95%, agitados suavemente durante 10 segundos e após 5 minutos foram centrifugados durante 20 minutos a 3000 rpm. Os complexos de corantes de mucina foram dissociados pela adição de uma diluição de 2: 1 de Aerosol OT (Docussato de sódio, Sigma Ultra, mínimo 99%, solução a 10%, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA) em água destilada e misturada sob breve sonicação. Subsequentemente, as amostras foram extraídas com volumes iguais de éter etílico sob agitação vigorosa. A solução resultante foi centrifugada durante 15 minutos a 3000 rpm e a concentração de corante foi determinada por espectrofotômetro a 605 nm na camada aquosa. A concentração de proteína total foi determinada pelo método de Lowry (23, 37) e foi utilizada para normalizar a absorbância durante a análise das amostras de mucina. Os resultados foram expressos como porcentagem do grupo controle / 75 dias, o qual foi considerado como 100%.

Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e submetidos às análises estatísticas. A normalidade e a homocedasticidade dos dados foram verificadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações múltiplas dos resultados foram realizadas por análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de $p < 0,05$ para todas as comparações. As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Graph Pad Prism (versão 6.0, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Peso das glândulas submandibulares

O tratamento com aguardente de cana diminuiu o peso absoluto das glândulas submandibulares em relação aos grupos controles. Houve diferença estatisticamente significativa do peso das glândulas dos animais tratados (GE75 e GE105) em relação aos animais controle (GC75 e GC105, $p < 0,0001$) ao compará-los separadamente. Confrontando os GE75 e GE105, observou-se que houve pouca redução do peso absoluto das glândulas dos animais tratados com aguardente de cana por 75 e 105 dias e, conseqüentemente a relevância estatística não foi alcançada ($p = 0,7858$).

Resultados semelhantes foram observados no peso relativo da glândula submandibular. Verificou-se menor peso relativo nos grupos de 75 dias (GE75, $p = 0,0008$) e 105 dias (GE105, $p = 0,0222$) de tratamento com aguardente de cana em relação aos seus respectivos controles (GC75 e GC105). Também foi observada diminuição do peso nos períodos experimentais (GE75 e GE105), porém sem diferenças estatisticamente significantes ($p = 0,4034$, Tabela 1).

Tabela 1. Peso absoluto e relativo das glândulas submandibulares.

Tempo (dias)	Peso Absoluto (mg)		Peso relativo (mg/g p.c.)	
	Controle	Experimental	Controle	Experimental
75	0,38 ± 0,058	0,15 ± 0,035*	0,77 ± 0,073	0,56 ± 0,089*
105	0,36 ± 0,022	0,17 ± 0,012*	0,62 ± 0,071	0,50 ± 0,087*

Médias dos valores (mg) e desvio padrão da média dos pesos absolutos e relativos. Avaliação estatística utilizando o teste two-way ANOVA, seguido pelo teste de *Tukey*. Significância estatística adotada $p < 0,05$. Símbolos: * $p < 0,05$ grupo experimental *versus* controle no mesmo dia.

Análise Histomorfométrica

A partir das imagens histológicas, foram realizadas as análises morfométricas (Figura 2). Em uma avaliação das diferentes estruturas presentes na glândula submandibular, observou-se que os ductos estriados apresentavam uma área menor nos grupos tratados, aos 75 dias houve redução de 11% e aos 105 de 19% em relação aos controles, porém não houve diferença estatisticamente significativa nos grupos GE75 ($p=0,8637$) e GE105 ($p=0,5183$) em comparação aos seus respectivos controles (GC75 e GC105). Na comparação entre os períodos (GE75 e GE105), houve progressão na redução dos ductos estriados sem relevância estatística ($p=0,9594$, Figura 3).

Observou-se, nos grupos tratados uma tendência a aumentar a área dos ductos granulosos, houve aumento de 17% da área ao 75º dia, entretanto não se mostrou com diferença estatisticamente significativa (GE75, $p=0,0951$). Ao 105º dia houve 18% de aumento da área e não obteve-se estatística significativa (GE105, $p=0,1135$) em relação aos seus controles. Apesar de ocorrer pequeno aumento dos ductos granulosos entre GE75 e GE105, não foi possível observar significância estatística no intervalo de tratamento ($p=0,9814$, Figura 4).

A área dos ácinos encontrava-se com redução de 10% e 11% aos 75 e 105 dias respectivamente e com estatística significativa no grupo GE75 ($p=0,0178$) e GE105 ($p=0,0307$) em comparação com os grupos controle GC75 e GC105. Entre os períodos experimentais de GE75 e GE105, houve pouca redução dos ácinos e desta forma não foi estatisticamente relevante ($p=0,9287$, Figura 5).

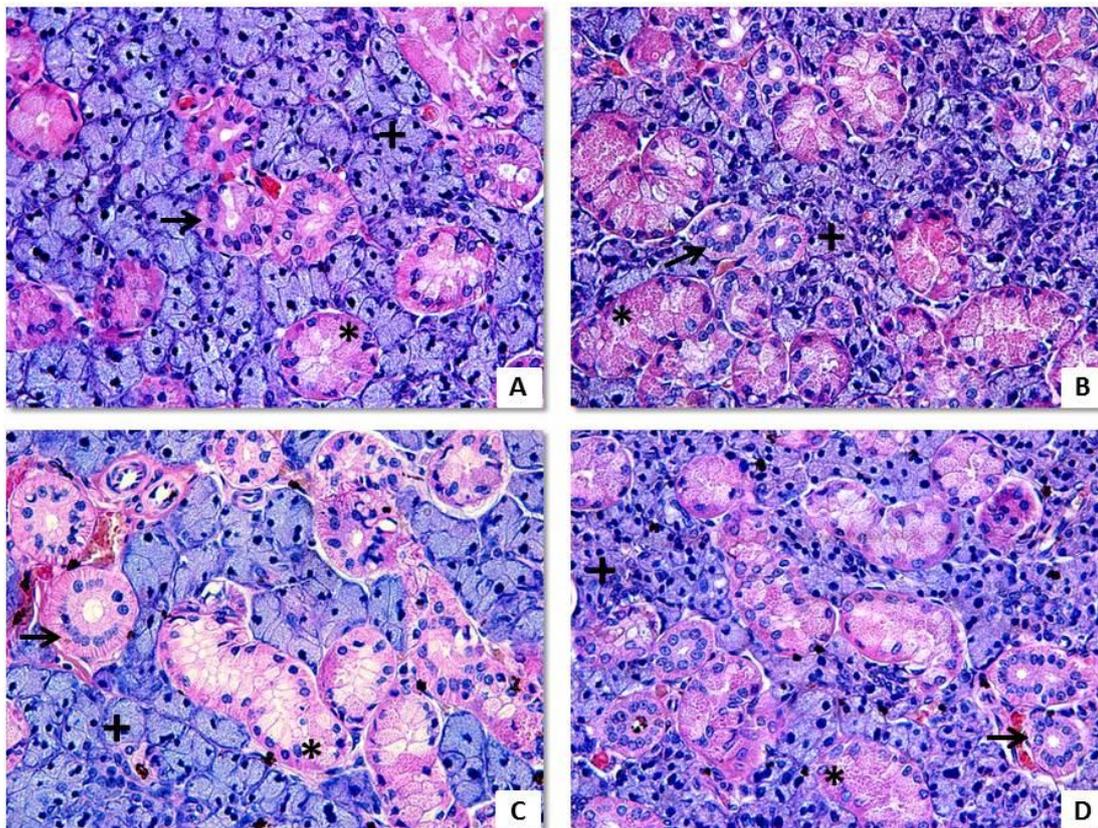


Figura 2. Fotomicrografia das análises histomorfométricas do tecido glandular. (A) GC75, (B) GE75, (C) GC105, (D) GE105. A seta indica os ductos estriados, o asterisco os ductos granulosos e a cruz indica os ácinos. (HE 40X).

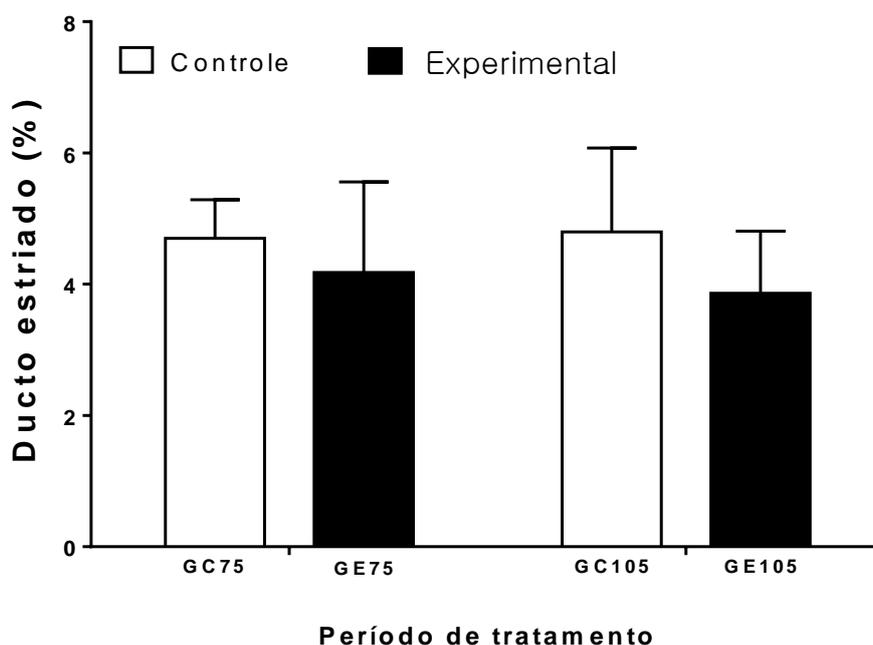


Figura 3. Representação gráfica da porcentagem de área de ductos estriados. Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média. Avaliação estatística utilizando o teste two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Significância estatística adotada $p < 0.05$.

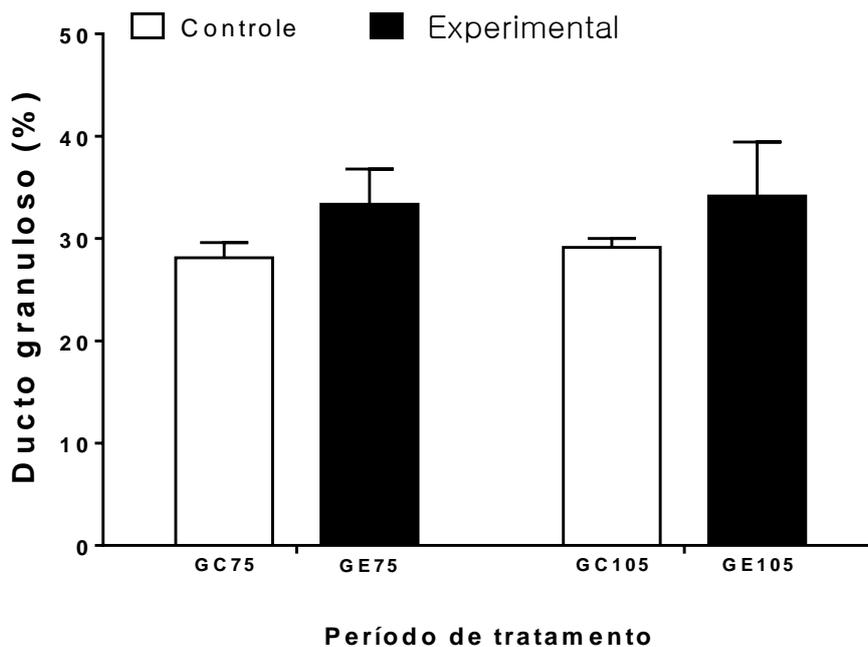


Figura 4. Representação gráfica da porcentagem de área de ductos granulosos. Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média. Avaliação estatística utilizando o teste two-way ANOVA, seguido pelo teste de *Tukey*. Significância estatística adotada $p < 0.05$.

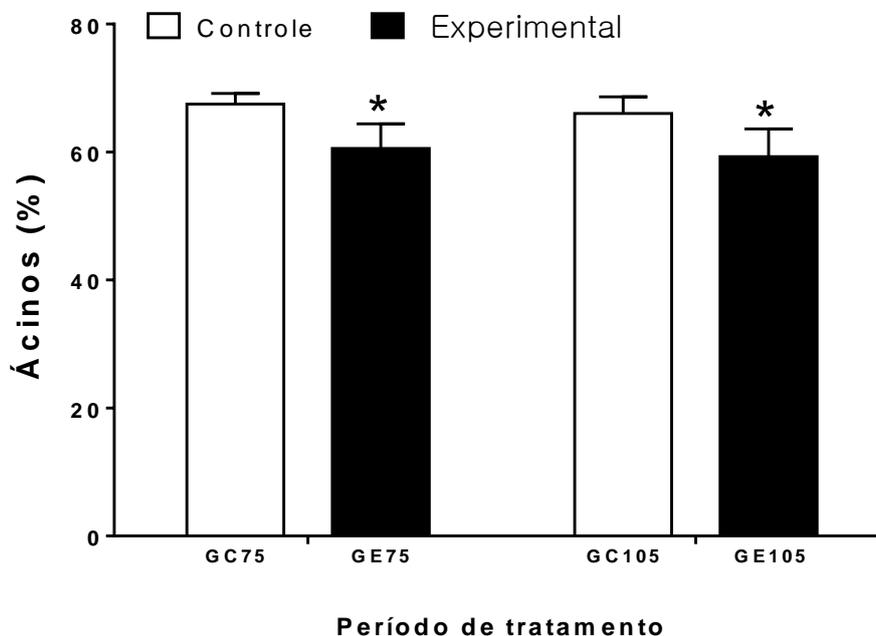


Figura 5. Representação gráfica da porcentagem de área dos ácinos. Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média. Avaliação estatística utilizando o teste two-way ANOVA, seguido pelo teste de *Tukey*. Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: * $p < 0.05$ grupo experimental *versus* controle no mesmo dia.

Parâmetros bioquímicos da atividade das fosfatases

A atividade específica da FAT na glândula submandibular dos ratos submetidos ao alcoolismo crônico variou consideravelmente em relação ao grupo controle. No grupo tratado GE75 houve redução de 17% da FAT ($p=0,0273$) em relação ao grupo controle GC75, enquanto ao 105° dia (GE105) a redução foi de 42% ($p<0,0001$) comparado ao seu controle (GC105). Entre os períodos de GE75 e GE105 a redução de FAT também foi significativa ($p=0,0011$, Figura 6).

Resultados semelhantes foram encontrados na atividade específica de FART, que apresentou redução nos grupos tratados com aguardente de cana. No grupo GE75 houve a redução de 15% da atividade de FART sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,1383$) comparado ao GC75. Enquanto que no grupo GE105 a redução foi de 39% e apareceu de forma relevante ($p<0,0001$) contrastado ao controle GC105. Na comparação para o fator período de GE75 e GE105, houve uma redução gradativa de FART com significância estatística ($p=0,0393$, Figura 7).

A dosagem de atividade de FAL mostrou-se aumentada no grupo GE75 em relação ao controle GC75, mas não foi estatisticamente significativa ($p=0,6911$). Houve um declínio da FAL no grupo GE105 em relação ao GC105, sem relevância estatística ($p=0,4450$). Quanto a comparação entre os períodos experimentais de GE75 e GE105, ocorreu pequena redução de FAL e assim sem estatística significativa ($p=0,3739$, Figura 8).

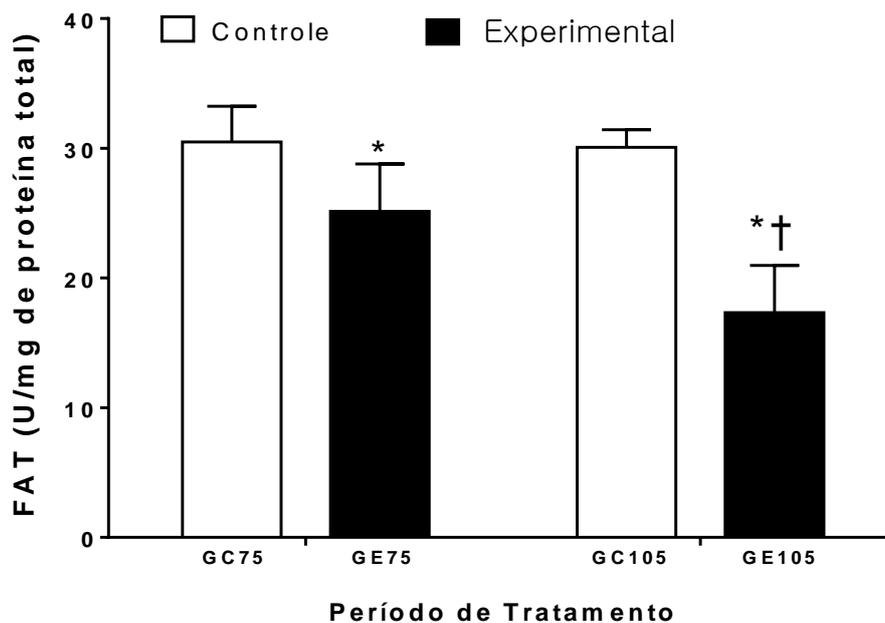


Figura 6. Efeito do alcoolismo crônico na atividade da FATT nas glândulas submandibulares. Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média. Avaliação estatística utilizando o teste two-way ANOVA, seguido pelo teste de *Tukey*. Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: * $p < 0.05$ grupo experimental versus controle no mesmo dia; † $p < 0.05$ grupo experimental 75 dias versus grupo experimental 105 dias.

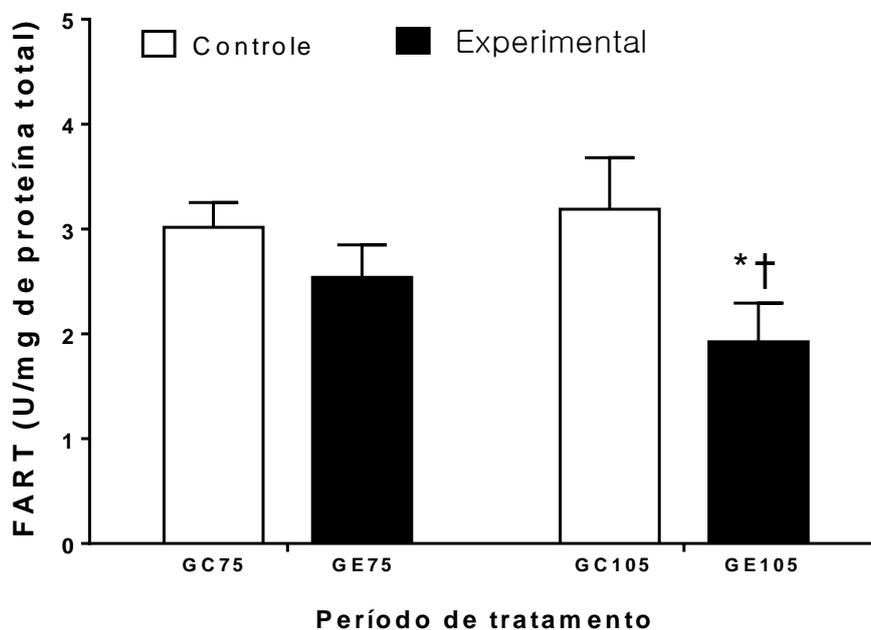


Figura 7. Efeito do alcoolismo crônico na atividade da FART nas glândulas submandibulares. Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média. Avaliação estatística utilizando o teste two-way ANOVA, seguido pelo teste de *Tukey*. Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: * $p < 0.05$ grupo experimental versus controle no mesmo dia; † $p < 0.05$ grupo experimental 75 dias versus grupo experimental 105 dias.

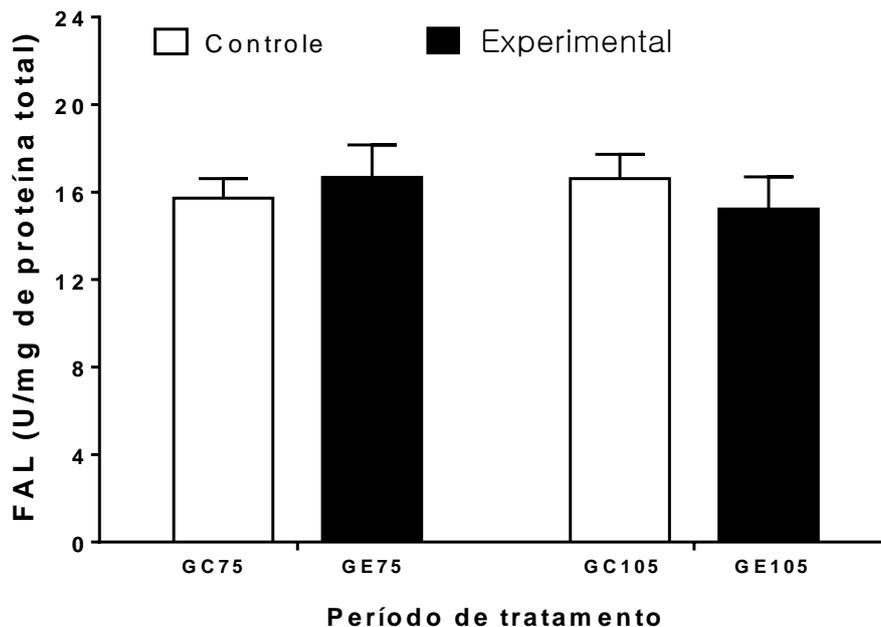


Figura 8. Efeito do alcoolismo crônico na atividade da FAL nas glândulas submandibulares. Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média. Avaliação estatística utilizando o teste two-way ANOVA, seguido pelo teste de *Tukey*. Significância estatística adotada $p < 0.05$.

Ao analisarmos os níveis da mucina, observamos que os animais tratados com álcool apresentaram níveis mais baixos. Aos 75 dias (GE75) não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,6072$) em relação ao controle (GC75). No grupo GE105 houve redução significativa da mucina ($p=0,0331$) comparada ao controle GC105. Em relação ao período experimental de GE75 e GE105 houve redução dos níveis de mucina com estatística significativa ($p=0,0477$, Figura 9).

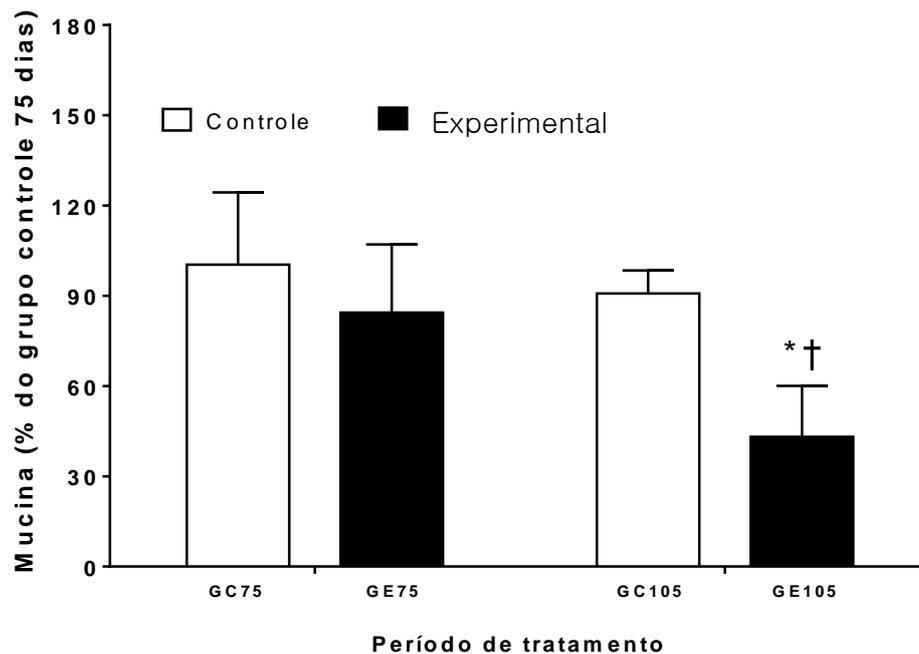


Figura 9. Efeito do alcoolismo crônico sobre os níveis de mucina nas glândulas submandibulares. Os dados foram expressos como média e desvio padrão da média. Avaliação estatística utilizando o teste two-way ANOVA, seguido pelo teste de *Tukey*. Significância estatística adotada $p < 0.05$. Símbolos: * $p < 0.05$ grupo experimental versus controle no mesmo dia; † $p < 0.05$ grupo experimental 75 dias versus grupo experimental 105 dias.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O primeiro indício em nossos resultados que revela o efeito deletério do alcoolismo crônico nas glândulas submandibulares foi a significativa redução do peso dos órgãos dos animais tratados em relação aos controles. Estes achados foram corroborados por outros trabalhos (10, 42) e, inclusive, Faustino e Stipp (2003) (10) observaram também redução da massa corpórea de animais induzidos ao alcoolismo crônico, além da diminuição da massa glandular (10). Esta redução poderia ser explicada pelo fato de que o álcool causa a sensação de saciedade no indivíduo e, conseqüentemente, uma ausência da vontade de se alimentar. Sem apetite, haveria pouco estímulo das glândulas salivares e, crônica e eventualmente, levaria à atrofia e diminuição do peso glandular (43).

Por outro lado, Fernandes et al. (2015) (36) em seu trabalho com ratas adolescentes tratadas com etanol por gavagem, detectaram um aumento no peso da glândula parótida e nenhuma alteração nas glândulas submandibulares de animais expostos e bebidas alcoólicas (36). Estudos com humanos associaram o aumento de peso glandular aos indivíduos que já estavam com cirrose hepática por alcoolismo e, conseqüentemente, com efeitos mais graves devido a doença (44). Outra explicação para este achado seria o acúmulo de tecido adiposo nas estruturas glandulares (8, 9, 45) o que contribuiria para o aumento da massa glandular dos ratos submetidos ao tratamento com etanol. Em nossa amostra não foi observado este acúmulo de tecido gorduroso, portanto seria improvável detectarmos um aumento da massa das glândulas.

Nós também demonstramos que o uso excessivo de aguardente de cana afetou a morfologia das glândulas submandibulares ao quantificarmos os ductos e os ácinos. As áreas dos ductos estriados encontravam-se diminuídos nos grupos tratados enquanto os ductos granulosos estavam moderadamente aumentados nos animais tratados com etanol quando comparados aos controles. Em nosso estudo somente o ducto granuloso encontrava-se com área aumentada e acreditamos que há maior sensibilidade desta estrutura após o alcoolismo crônico.

Outro fato interessante é que as células dos ductos granulosos de roedores produzem hormônios e diversos fatores de crescimento celular, muito distinto dos ductos estriados que possuem função restrita a secreção salivar e reabsorção de eletrólitos (46). Sendo assim o efeito agressivo do alcoolismo poderia estar associado a uma desordem desses fatores de crescimento e por isso o ducto granuloso é o único a apresentar aumento de sua área. Quanto ao ducto estriado acreditamos que por estar com funções diminuídas na atividade salivar sua área tende a ficar menor.

A quantidade de ácinos observada foi menor nos ratos tratados com aguardente de cana comparada ao controle nos dois períodos de tratamento. Deste modo sugere-se um potencial efeito do alcoolismo crônico em atrofiar de alguma forma a glândula submandibular, pois além de encontrarmos uma redução do peso glandular é possível observar a expressiva redução da área dos ácinos da glândula. Além disso, os ácinos são importantes secretores de saliva (47) e sua atrofia pode causar uma disfunção na produção e composição salivar.

Estes achados estão em concordância com o estudo de Faustino e Stipp (2003) (10) que ao observarem o volume dos ácinos de glândulas submandibulares de ratos alcoolizados por 20 semanas encontraram redução importante da estrutura. Resultados semelhantes foram encontrados em um trabalho com humanos, em que houve pequena redução no diâmetro dos ductos de glândulas parótidas de alcoolistas (48). Fagundes et al. (2016) (49) propôs um modelo experimental de 1 a 4 semanas de exposição alcoólica em animais e relatou que também há redução das células mioepiteliais da glândula submandibular no curto período de tratamento.

Em contrapartida vários estudos relatam a hipertrofia das estruturas glandulares e associam a circunstância ao acúmulo de tecido adiposo nos tecidos adjacentes após o alcoolismo crônico (36, 50, 51). Tirapelli et al. (2001) (45) analisou glândulas submandibulares de ratos após alcoolismo crônico de 5, 10 e 15 meses e relatou intensa redução das células acinares e ductais, porém houve aumento das área total das estruturas que foi associado ao acúmulo de tecido adiposo no tecido conjuntivo interlobular.

De qualquer forma os resultados exibidos na literatura a respeito da morfologia glandular após uso de excessivo álcool são controversos e isso parece estar relacionado ao fato das diferentes metodologias empregadas, uma vez que os estudos utilizam formas distintas de indução ao alcoolismo, como a forma semi-voluntária (10, 45) e por gavagem (36). Há também diferenças entre dosagem, concentração alcoólica e tempo de exposição e estes podem ser os causadores dos divergentes resultados, dificultando assim a comparação.

O presente estudo fornece evidências de que o sistema funcional bioquímico na glândula submandibular de rato também é claramente alterado pelo uso prolongado da bebida alcoólica. Apesar da FAL não se mostrar alterada significativamente, a FAT e FART demonstraram uma diminuição progressiva relacionada aos tempos experimentais. Nenhum estudo até momento analisou a funcionalidade bioquímica das fosfatases em glândulas salivares associadas a alcoolismo crônico.

As fosfatases estão presentes na glândula submandibular de formas diferentes. Estudos imunoistoquímicos tem confirmado a presença da FAT nas células ductais, estriadas e mioepiteliais de glândulas parótidas e submandibulares em humanos, já a presença da FART nas células dos ductos estriados da submandibular, tem sugerido a importância desta enzima na troca de água e íons durante a modificação da saliva seromucosa (23) enquanto a presença de FAL foi observada na superfície luminal dos ductos estriados e excretorios (31).

Basseto et al. (2001) (34) relataram que houve marcante diminuição da atividade funcional de FAT em glândulas sublinguais devido a exposição crônica a fumaça de cigarro, demonstrando a sensibilidade dessas enzimas a efeitos tóxicos. Dado semelhante foi encontrado em nosso estudo com a redução da atividade de FAT e FART após ingestão de aguardente de cana. Em contrapartida em um estudo imunoistoquímico com coelhos diabéticos, houve aumento na intensidade da reação da FAT em todas as partes dos ácinos e expressivo aumento da FAL nas células mioepiteliais de glândulas parótidas e submandibulares evidenciando uma alteração na atividade enzimática, porém relacionada a alteração metabólica (33).

Outra pesquisa analisou a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase e glutathione peroxidase) nas glândulas parótidas de ratos tratados com etanol e relatou um aumento da atividade dessas enzimas (52). Enzimas estas diferentes das que utilizamos neste trabalho, mas que demonstram a suscetibilidade das alterações bioquímicas causadas pelo alcoolismo crônico em glândulas salivares.

As fosfatases estão presentes nas glândulas salivares, regulando diversos mecanismos celulares e, portanto seu aumento ou diminuição tem por consequência causar uma disfunção do órgão (53). Diante disso nossos resultados demonstram alterações bioquímicas nas glândulas submandibulares após alcoolismo crônico, devido a diminuição da funcionalidade das fosfatases e apesar dos mecanismos não estarem esclarecidos, notamos que além do efeito tóxico causado pelo alcoolismo, há também uma relação tempo-dependente já que o uso prolongado mostrou inibir gradativamente a atividade bioquímica de FAT e FART nas glândulas submandibulares.

Os resultados deste estudo mostram que o alcoolismo crônico em animais está relacionado a um decréscimo significativo dos níveis de mucina. Houve redução nos dois períodos experimentais com maior discrepância aos 105 dias, sugerindo que a redução das mucinas na glândula submandibular se acentua com o uso prolongado da substância alcoólica.

Semelhante às fosfatases, a redução dos níveis de mucina pode ser considerado um efeito da toxicidade do alcoolismo comprometendo a função bioquímica da glândula na síntese ou secreção de mucinas. Os mecanismos exatos não foram elucidados, porém em estudos *in vitro* com células de

glândulas salivares tratadas com etanol foi demonstrado que o etanol afeta a síntese das mucinas ao inibir as enzimas responsáveis pela sua produção (19, 54).

É possível observar o conjunto de comprometimentos bioquímicos que ocorreram na glândula submandibular pelos efeitos do consumo excessivo de aguardente de cana. Com a redução da mucina há provável falta das suas propriedades na saliva de alcoolistas e desta forma resultar na perda de sua total funcionalidade.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Diante do exposto, podemos concluir que o alcoolismo crônico decorrente do uso de aguardente de cana gera efeitos tóxicos importantes nas glândulas submandibulares. Os dados do presente trabalho revelam que animais expostos cronicamente ao álcool apresentaram sinais de degradação morfológica e funcional em comparação aos controles. Sendo assim, nossos achados suportam a hipótese de que a morfologia e função bioquímica da glândula são comprometidas pelo alcoolismo crônico e podem alterar composição e fluxo salivar.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. MEHTA AJ Alcoholism and critical illness: A review. *World J Crit Care Med* 2016; 5: 27-35.
2. COLLINS SE Associations Between Socioeconomic Factors and Alcohol Outcomes. *Alcohol Res* 2016; 38: 83-94.
3. CHENG HG, CHANDRA M, ALCOVER KC et al. Rapid transition from drinking to alcohol dependence among adolescent and young-adult newly incident drinkers in the United States, 2002-2013. *Drug Alcohol Depend* 2016; 168: 61-68.
4. WILSON S, MALONE SM, THOMAS KM et al. Adolescent drinking and brain morphometry: A co-twin control analysis. *Dev Cogn Neurosci* 2015; 16: 130-8.
5. SAITZ R Clinical practice. Unhealthy alcohol use. *N Engl J Med* 2005; 352: 596-607.
6. ROOM R, BABOR T, REHM J Alcohol and public health. *Lancet* 2005; 365: 519-30.
7. HOLT S, TETRAULT J Unhealthy Alcohol Use. *Clin Liver Dis* 2016; 20: 429-44.
8. 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: 837-40.
9. DUTTA SK, ORESTES M, VENGULEKUR S et al. Ethanol and human saliva: effect of chronic alcoholism on flow rate, composition, and epidermal growth factor. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 350-4.
10. FAUSTINO SE, STIPP AC [Effects of chronic alcoholism and alcoholic detoxication on rat submandibular glands: morphometric study]. *J Appl Oral Sci* 2003; 11: 21-6.
11. WASZKIEWICZ N, JELSKI W, ZALEWSKA A et al. Salivary alcohol dehydrogenase in non-smoking and smoking alcohol-dependent persons. *Alcohol* 2014; 48: 611-6.
12. ENBERG N, ALHO H, LOIMARANTA V et al. Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 92: 292-8.
13. RIEDEL F, GOESSLER UR, HORMANN K Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Dig Dis* 2005; 23: 195-203.
14. WASZKIEWICZ N, ZALEWSKA-SZAJDA B, ZALEWSKA A et al. Decrease in salivary lactoferrin output in chronically intoxicated alcohol-dependent patients. *Folia Histochem Cytobiol* 2012; 50: 248-54.
15. WASZKIEWICZ N, ZALEWSKA-SZAJDA B, ZALEWSKA A et al. Salivary lysozyme in smoking alcohol dependent persons. *Folia Histochem Cytobiol* 2012; 50: 609-12.
16. WASZKIEWICZ N, ZALEWSKA A, SZAJDA SD et al. The effect of chronic alcohol intoxication and smoking on the output of salivary immunoglobulin A. *Folia Histochem Cytobiol* 2012; 50: 605-8.
17. WASZKIEWICZ N, ZALEWSKA A, SZULC A et al. The influence of alcohol on the oral cavity, salivary glands and saliva. *Pol Merkur Lekarski* 2011; 30: 69-74.

18. WASZKIEWICZ N, CHOJNOWSKA S, ZALEWSKA A et al. Salivary hexosaminidase in smoking alcoholics with bad periodontal and dental states. *Drug Alcohol Depend* 2013; 129: 33-40.
19. SLOMIANY BL, SLOMIANY A Ghrelin Protection against Cytotoxic Effect of Ethanol on Rat Salivary Mucin Synthesis involves Cytosolic Phospholipase A2 Activation through S-Nitrosylation. *Int J Biomed Sci* 2010; 6: 37-44.
20. MANDEL ID A contemporary view of salivary research. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4: 599-604.
21. TABAK LA Structure and function of human salivary mucins. *Crit Rev Oral Biol Med* 1990; 1: 229-34.
22. SONG JY, TIGCHELAAR W, SCHELLENS JP et al. Ultrastructural localization of activity of phosphatases by low temperature incubation of unfixed cryostat sections. *Histochem Cell Biol* 1996; 106: 351-5.
23. ISACSSON G A histochemical study of rat salivary gland acid phosphatase. *Arch Oral Biol* 1986; 31: 95-9.
24. SHIRAKAWA S, MOCHIZUKI H, KOBAYASHI S et al. Immunohistochemical and immunoblotting identification of protein phosphatase 1 gamma 1 in rat salivary glands. *FEBS Lett* 1996; 393: 57-9.
25. BULL H, MURRAY PG, THOMAS D et al. Acid phosphatases. In.: *Mol Pathol* 2002; 65-72
26. LAMP EC, DREXLER HG Biology of tartrate-resistant acid phosphatase. *Leuk Lymphoma* 2000; 39: 477-84.
27. ODDIE GW, SCHENK G, ANGEL NZ et al. Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone* 2000; 27: 575-84.
28. COLEMAN JE Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992; 21: 441-83.
29. CHAVES NETO A, SASSAKI K, NAKAMUNE A. Protein phosphatase activities in the serum and saliva of healthy children. *RPG Rev Pos Grad*, 2011; 90-95.
30. BEAL AM Enzyme activity in parotid and mandibular saliva from red kangaroos, *Macropus rufus*. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 695-9.
31. HARRISON JD, AUGER DW, BADIR MS Ultrastructural phosphatase histochemistry of submandibular and parotid salivary glands of man. *Histochem J* 1988; 20: 117-21.
32. TAKUMA T, ICHIDA T Okadaic acid inhibits amylase exocytosis from parotid acini stimulated by cyclic AMP. *FEBS Lett* 1991; 285: 124-6.
33. MACIEJEWSKI R, HERMANOWICZ-DRYKA T, CZERNY K et al. Changes of the ATPase, acid phosphatase and alkaline phosphatase reaction intensity in the parotid and submandibular glands of rabbits in experimental diabetes. *Folia Histochem Cytobiol* 1999; 37: 99-100.
34. BASSETO A, NEVES F, TOLEDO S et al. Effect of cigarette smoke on sublingual gland and liver phosphotyrosine protein phosphatase and acid phosphatase activities. In.: *Rev FOB*, 2001; 49-54.
35. SILVA ARS, RIBEIRO ACP, SALZEDAS LP et al. Análise da densidade óssea radiográfica de ratos submetidos ao alcoolismo crônico utilizando imagem digital. In. *Revista Odonto Ciência*, 2007; 22: 77-81.
36. FERNANDES LM, TEIXEIRA FB, ALVES-JUNIOR SM et al. Immunohistochemical changes and atrophy after chronic ethanol intoxication in rat salivary glands. *Histol Histopathol* 2015; 30: 1069-78.

37. HARTREE EF Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 1972; 48: 422-7.
38. RENNICK LA, CAMPBELL PM, NAIDU A et al. Effectiveness of a novel topical powder on the treatment of traumatic oral ulcers in orthodontic patients: A randomized controlled trial. *Angle Orthod* 2016; 86: 351-7.
39. JANCKILA AJ, PARTHASARATHY RN, PARTHASARATHY LK et al. Properties and expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a by monocyte-derived cells. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 209-18.
40. HALL RL, MILLER RJ, PEATFIELD AC et al. A colorimetric assay for mucous glycoproteins using Alcian Blue [proceedings]. *Biochem Soc Trans* 1980; 8: 72.
41. SAROSIEK J, ROURK RM, PIASCIK R et al. The effect of esophageal mechanical and chemical stimuli on salivary mucin secretion in healthy individuals. *Am J Med Sci* 1994; 308: 23-31.
42. MAIER H, BORN IA, VEITH S et al. The effect of chronic ethanol consumption on salivary gland morphology and function in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 1986; 10: 425-7.
43. LIEBER CS Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol: 1991 update. *Alcohol Clin Exp Res* 1991; 15: 573-92.
44. ABELSON DC, MANDEL ID, KARMIOL M Salivary studies in alcoholic cirrhosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976; 41: 188-92.
45. TIRAPELLI L, TIRAPELLI C, TIRAPELLI D et al. Morphometric analysis of seromucous acini and granular ducts of submandibular glands from rats (*Rattus norvegicus*) submitted to experimental chronic alcoholism In.: *Rev. Chil. Anat.*, 2001.
46. AMANO O, MIZOBE K, BANDO Y et al. Anatomy and histology of rodent and human major salivary glands: -overview of the Japan salivary gland society-sponsored workshop-. *Acta Histochem Cytochem* 2012; 45: 241-50.
47. PROCTOR GB, CARPENTER GH Salivary secretion: mechanism and neural regulation. *Monogr Oral Sci* 2014; 24: 14-29.
48. SMITH PF, RAMIREZ JC, ROMO RE et al. Salivary glands in alcoholism: a histologic and sialographic study. *Addict Biol* 1996; 1: 385-93.
49. FAGUNDES NC, FERNANDES LM, PARAENSE RS et al. Binge Drinking of Ethanol during Adolescence Induces Oxidative Damage and Morphological Changes in Salivary Glands of Female Rats. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 7323627.
50. CARRANZA M, FERRARIS ME, GALIZZI M Structural and morphometrical study in glandular parenchyma from alcoholic sialosis. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 374-9.
51. BANDERAS JA, GAITAN LA, PORTILLA J et al. Effects of chronic ethanol consumption on the rat parotid gland. *Arch Oral Biol* 1992; 37: 69-72.
52. CAMPOS SC, MOREIRA DA, NUNES TD et al. Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis. *Arch Oral Biol* 2005; 50: 661-8.
53. PURUSHOTHAM KR, WANG P, HUMPHREYS-BEHER MG Effect of vanadate on amylase secretion and protein tyrosine phosphatase activity in the rat parotid gland. *Mol Cell Biochem* 1995; 152: 87-94.
54. SLOMIANY BL, LIAU YH, ZALESNA G et al. Effect of ethanol on the in vitro sulfation of salivary mucin. *Alcohol Clin Exp Res* 1988; 12: 774-9.

ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo 1 – Certificado do Comitê de Ética no uso de animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals



PLS. *[Handwritten]*
PROG. *[Handwritten]*
RUBR. *[Handwritten]*

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Efeitos sistêmicos do alcoolismo crônico, em ratos. Análise histopatológica"**, Processo FOA nº 00442-2016, sob responsabilidade de Ana Maria Pires Soubhia apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 03 de Agosto de 2016.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 23 de Fevereiro de 2017.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 23 de Março de 2017.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Systemic effects of chronic alcoholism in rats. Analysis histopathology"**, Protocol FOA nº 00442-2016, under the supervision of Ana Maria Pires Soubhia presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on August 03, 2016.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: February 23, 2017.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: March 23, 2017.

[Handwritten Signature]
Profa. Ass. Dra. Maria Gisela Laranjeira
Coordenadora da CEUA
CEUA Coordinator

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça – CEP: 16015-050 – ARAÇATUBA – SP
Fone (18) 3636-3234 Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

Anexo 2 – Normas do periódico selecionado para envio

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)16000714/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)16000714/homepage/ForAuthors.html)