



FMUC FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AVALIAÇÃO DE MÚSCULOS MASTIGADORES NUM MODELO DE ALCOOLISMO EXPERIMENTAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

ALUNA: SARA ISABEL LAGES CORREIA

ORIENTADOR: MESTRE DR. RODRIGO FARINHA

CO-ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR SILVÉRIO CABRITA

Coimbra, Julho de 2015

AGRADECIMENTOS

No terminar desta etapa tão crucial da minha vida, não posso deixar de agradecer a todos os que a tornaram possível.

Agradeço ao meu orientador Mestre Doutor Rodrigo Farinha, pela disponibilidade, ajuda, simpatia, pelas palavras de encorajamento, tendo despendido muito do seu tempo para me orientar com toda a paciência e dedicação na realização deste trabalho.

Agradeço ao meu co-orientador Professor Doutor António Silvério Cabrita por todo o conhecimento transmitido e toda a disponibilidade que sempre demonstrou ao longo da realização da tese.

Ao Mestre Engenheiro Ricardo Cabeças que deu uma ajuda crucial, sempre me apoiou muito para além das suas obrigações foi incansável no esclarecimento de dúvidas, análise estatística dos dados e formatação da tese.

Ao Mestre Doutor Eduardo Costa pelo apoio e disponibilidade que sempre me prestou.

Aos meus pais. . . . Que tornaram um sonho realidade. A eles e a minha irmã agradeço pelas palavras, carinho, disponibilidade, encorajamento, dedicação, paciência com que sempre me brindaram. Agradeço pelos momentos em que me deram o ombro para eu chorar, por me limparem as lágrimas, por acreditarem em mim. Agradeço acima de tudo por existirem na minha vida, tudo o que sou hoje devo-o a eles. À Madalena e ao Pedro por fazerem sorrir por me fazerem tao feliz, por se terem tornado os (pequenos) mais importantes da minha vida.

Ao Daniel que se mostrou sempre disponível em me ajudar. A toda a minha família, que sempre me apoiou. Ao Duarte, pela paciência, encorajamento, amizade ao longo deste longo trajeto, por tantas vezes me segurar na mão, por me limpar as lágrimas e acreditar em mim.

Ao André pelo apoio incondicional, por estar presente nos momentos mais difíceis, pelo carinho e amizade. Aos meus amigos que sempre me apoiaram, a nível académico e pessoal, por terem sempre a palavra certa, a força que me faltava, a confiança e amizade que me permitiram lutar.

O meu muito obrigado aqueles que fizeram parte da minha vida e tanto marcaram esta

caminhada. Apesar da vida nos colocar em caminhos opostos, fica aqui o meu eterno agradecimento. Sem eles nada disto teria sido possível. Sem eles hoje não estaria aqui.

O meu muito obrigado

Índice

Introdução	1
A origem do Universo e dos elementos químicos	1
Oligoelementos	3
O tecido muscular	5
Músculos mastigadores	7
O etanol	8
Objetivos	10
Materiais e Métodos	11
Preparação e distribuição dos animais	11
Sacrifício, colheitas e registos	11
Histologia	11
Análise de fluorescência de raios-X (XRF)	12
Análise estatística	14
Resultados	16
Discussão	22
Conclusões	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

Lista de Figuras

1	Equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.	12
2	Ilustração do local de incidência do feixe de raio-X. Fonte: imagem fotografada pelo autor.	13
3	Gráfico do espectro de energias criado pelo software do equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.	13
4	Distribuição dos resultados dos elementos P, S e K do grupo de controlo (esquerda) e do grupo de teste (direita).	21

Lista de Tabelas

1	Média e desvio padrão das contagens por segundo obtidas nos grupos controle e teste, com a respectiva significância estatística (valor de p).	17
2	Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo controle.	19
3	Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo teste.	19
4	Valores de p obtidos a partir dos coeficientes dos vários elementos com o potássio, fósforo e enxofre, entre o grupo controle e teste.	20
5	Alteração dos elementos - Conclusão.	20

Resumo

Todos os tecidos animais contêm elementos inorgânicos ou minerais em variadas quantidades e proporções. O tecido muscular é formado por células diferenciadas para uma utilização otimizada da contratilidade, através da geração de forças pelos microfilamentos e proteínas, capaz de impulsionar movimento. O objetivo do presente trabalho é avaliar a influência da ingestão alcoólica sobre a constituição elemental do músculo mastigador masseter. Neste estudo foram usados 20 ratos Wistar, macho, com oito semanas no início do estudo. Os ratos foram distribuídos em dois grupos de 10 animais cada. O Grupo I constitui o grupo controle, mantido nas condições padrão do biotério, com água e alimento à disposição. O Grupo II foi submetido à administração de uma solução de etanol a 5% que substituiu a água de bebida, durante 4 semanas. Em todos os animais foram colhidos fragmentos do músculo masseter para análise histopatológica de rotina e fragmentos de músculo masseter para análise de fluorescência de raios-X, com energia de 15 keV e com tempo de exposição de 200s. Nos espectros obtidos, foi removida a radiação de fundo, permitindo a análise individual com quantificação da presença de alumínio (Al), fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio (K), cálcio (Ca) e ferro (Fe). A análise comparativa dos espectros elementares do músculo masseter nos animais do grupo controle e do grupo teste permite observar alterações da composição atômica entre os dois grupos, em particular do alumínio, fósforo, enxofre, cloro, potássio e ferro. Todos os indivíduos submetidos à ingestão experimental de etanol não apresentaram alterações morfológicas do músculo masseter. Foram observadas alterações da constituição elemental dos músculos mastigadores neste modelo experimental de alcoolismo.

Abstract

All animal tissues contain inorganic or mineral elements, in varying amounts. Muscle tissue is composed of differentiated cells for optimal of contractility, by generating forces by microfilaments and proteins, with the ability of propelling movement.

The aim of this work is to evaluate the influence of alcohol intake on the elemental constitution of masticatory masseter muscle.

In this study 20 male Wistar rats, eight weeks old at the beginning of the study were used. The animals were distributed into two groups of 10 individuals each. Group I was the control group, maintained for 8 weeks without manipulation. Group II was subjected to the administration of a 5% ethanol solution as drinking water for 4 weeks.

In all animals were collected masseter muscle fragments for routine histopathological analysis and masseter muscle fragments for fluorescence X-ray analysis with energy of 15 keV and an exposure time of 200s. In the spectra obtained, background radiation was removed, allowing individual quantifying of the presence of aluminum (Al), phosphorus (P), sulfur (S), chlorine (Cl), potassium (K), calcium (Ca), and iron (Fe).

The comparative analysis of the elemental spectra of the masseter muscle of the animals in the control and test groups allows to observe changes in atomic composition between the two groups, in particular aluminum, phosphorus, sulfur, chlorine, potassium and iron.

All animals undergoing experimental ethanol intake showed no morphological changes of the masseter muscle. There have been changes of elemental constitution of the studied muscle in this experimental model of alcoholism.

Introdução

A origem do Universo e dos elementos químicos

A origem do Universo situa-se há cerca de 13,7 mil milhões de anos, formado a partir de um estado de densidade e temperatura altamente elevadas. Nessa altura terá havido uma grande explosão e libertação de energia. Foram criados o espaço e o tempo e com o avançar do tempo gases, estrelas e planetas.^{1,2)} O Universo Primordial preencheu-se de radiação e partículas fundamentais, os "quarks", que se aglomeravam. Desde então o universo tem vindo a expandir, com a diminuição progressiva da temperatura e da energia acumulada. A matéria passou a predominar sobre a antimatéria.^{2,3}

Nos primeiros instantes da vida do Universo, a diminuição da temperatura permitiu a formação dos prótons, neutrões e eletrões e uma consequente estabilidade eletromagnética.⁴ Pouco tempo depois uma força nuclear muito forte, fez com que os prótons e os neutrões se ligassem entre si para formar os primeiros núcleos; de deutério, o primeiro elemento atómico existente. Designa-se esta génese por nucleossíntese primordial.^{4,5} O deutério é um isótopo do hidrogénio, o primeiro e o mais simples dos elementos, constituído, apenas por um próton e um neutrão. A diminuição progressiva da temperatura até cerca de um bilião de graus centígrados, permitiu que o elemento deutério capturasse prótons e neutrões e permitiu a formação de um novo elemento, constituído por um número progressivamente maior de prótons e de neutrões: o hélio, lítio e o berílio.^{2,5}

Os átomos formados pela nucleossíntese primordial foram-se aglutinando em nuvens de gás.^{1,4} A contração gravitacional de hidrogénio e berílio e o aumento de velocidade da nuvem de gás, permitiu a formação de vastos aglomerados de matéria: as protoestrelas.^{1,6}

A contração das protoestrelas, por ação da própria gravidade, provocou um aumento da sua pressão e da sua temperatura.¹ Criaram-se, assim, condições para a ocorrência de reações nucleares de transformação de hidrogénio em hélio e a consequente libertação de grande quantidade de energia sob a forma de radiações, com o aparecimento das primeiras estrelas.^{1,5}

A fase principal da vida da estrela termina quando todo o hidrogénio é utilizado e o hélio se funde em carbono, azoto e oxigénio.^{1,7} O hélio é demasiado estável, a sua força de ligação é muito elevada e é capaz de capturar todos os neutrões disponíveis.⁶⁻⁸ Quando três átomos de hélio se juntaram, formou-se o carbono.^{4,7}

Com o aparecimento do carbono inicia-se uma nova fase de fusão nuclear no interior das estrelas. Os núcleos de carbono combinam-se com núcleos de hélio para produzir o oxigénio.⁴ A nucleossíntese desenvolve-se em diferentes camadas da estrela: no centro, o hélio transforma-se em carbono e oxigénio; na parte superior, o hidrogénio transforma-se em hélio. Dois núcleos de carbono juntam-se e desenvolvem energia.¹ A fusão do carbono produz a formação de néon, oxigénio e magnésio e a fusão do oxigénio produz o silício e o enxofre.⁷ O silício e o enxofre produzem o ferro.⁹ Ao mesmo tempo que no núcleo da estrela se produz ferro, as reações nucleares prosseguem nas camadas exteriores, que se expandiram devido à energia propagada a partir do interior. Os elementos mais pesados estão situados no interior: uma camada de carbono rodeia uma camada de oxigénio, que, por sua vez, rodeia uma camada de silício, existindo um núcleo central constituído essencialmente por ferro.⁹

Com a produção de ferro, acabam as reações de fusão no núcleo da estrela.⁵ Não é possível fundir núcleos de ferro para criar núcleos de elementos mais pesados, pois esse processo requer energia, e em vez de a produzir, o processo culmina com a explosão de uma supernova, que lança para o espaço interestrelar parte da sua matéria, contendo os elementos pesados entretanto formados.^{6,7} A supernova marca a morte de algumas estrelas, e a produção de ingredientes para o desenvolvimento de vida: ferro, cálcio e sódio, que entram na composição de planetas, plantas e animais.^{4,5,9}

Oligoelementos

São elementos de baixo peso molecular, podendo ser definidos como os catalisadores no metabolismo das reações enzimáticas dos seres vivos. São sais minerais que estão presentes no organismo em pequenas quantidades (alguns miligramas por quilograma de peso corporal ou algumas partes por milhão).^{10,11}

O alumínio (Al) é o metal mais comum e o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre. Está presente nos pulmões, tecidos moles e osso. Apenas uma pequena parte do alumínio ingerido na dieta é absorvida pelo trato digestivo em indivíduos saudáveis, sendo a maior parte deste excretada por via renal. Encontra-se também em medicamentos e adjuvantes de vacinas. As partículas revestidas por alumínio são pouco biodegradáveis, sendo imediatamente fagocitadas quando injetadas no tecido muscular, difundindo-se pelas células do corpo. O alumínio quando em excesso induz neurotoxicidade.^{12,13}

A maioria do fósforo (P) presente no corpo humano encontra-se no tecido ósseo e dentes, juntamente com o cálcio. Apresenta um papel estrutural a nível celular, predominantemente nos fosfolípidos, constituintes das membranas celulares. É um dos mais importantes elementos e indispensáveis constituintes de todos os organismos vivos. É um elemento não-metálico com um papel fundamental para a célula, por contribuir para as transições bioquímicas necessários para os processos metabólicos, através da criação de ligações altamente energéticas em moléculas de ATP e ADP. Constitui assim uma reserva celular de energia. Na forma de fosfato, é uma contribuição fundamental para a manutenção do equilíbrio ácido-base. O fósforo liga-se a elementos como o ferro e o magnésio tornando-os menos disponíveis no corpo humano.¹⁴⁻¹⁷

O enxofre (S) é um nutriente essencial, existente em concentrações muito baixas no organismo humano, disponível no solo na forma de sulfato. As plantas são capazes de reduzir o enxofre inorgânico, para utilização num grande número de metabolitos primários e secundários. A redução de enxofre elementar em H₂S fornece uma fonte de energia celular e é antioxidante. Está envolvido no controlo da síntese de proteínas através da modificação do RNA de transferência e da regulamentação da atividade de enzimas.¹⁸⁻²⁰

Os íons de cloro são aniões dominantes do líquido extracelular. A sua função está subjacente ao equilíbrio ácido-base. A manutenção da quantidade ideal de íons hidrogénio nos líquidos intracelular e extracelular depende de um delicado equilíbrio químico entre os ácidos e as bases existentes no organismo e a manutenção de concentrações adequadas de água e eletrólitos num equilíbrio celular.¹⁴ O ião cloreto é um oxidante forte, reduzindo rapidamente outras substâncias com libertação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e esgota os mecanismos de defesa antioxidantes como o glutatião e o ácido ascórbico.²¹ A exposição a concentrações elevadas (> 50 ppm) pode danificar o trato respiratório inferior e o parênquima pulmonar causando pneumonia intersticial, edema pulmonar e morte por insuficiência respiratória progressiva.²² A sua toxicidade está ligada a lesão oxidativa das células epiteliais do pulmão, com perda de proteínas plasmáticas para os espaços alveolares, a produção de mediadores inflamatórios, influxos de neutrófilos para o tecido pulmonar e síndrome de doença reativa das vias respiratórias. A manifestação sistémica, caracteriza-se por inflamação e inativação da enzima monóxido de azoto.²¹

O potássio (K^+) é o catião intracelular mais importante. É transportado para o interior das células pelo mecanismo de transporte ativo, bomba de sódio, e tem ação fundamental na condução do impulso elétrico e na contração muscular. Participa juntamente com o cálcio na atividade muscular e regula a estimulação neuromuscular. O potássio participa no metabolismo dos hidratos de carbono, atua glicogénese, desempenha um papel importante no armazenamento de hidrogénio nas proteínas musculares (formação de massa magra), e participa na excreção renal de sódio.¹⁴

O cálcio (Ca) é um elemento químico importante para a formação de ossos e dentes, atua na coagulação sanguínea, transmissão nervosa, contração muscular, libertação e ativação enzimática, síntese, secreção e metabolismo de enzimas proteicas e permeabilidade da membrana plasmática.¹⁴

O corpo humano adulto contém cerca de quatro gramas de ferro, dois terços dos quais, associados à hemoglobina.¹⁴ O ferro é um óxido, sendo facilmente reduzido. É tóxico quando presente em excesso.²³

O tecido muscular

A maior parte dos movimentos do corpo são realizados pela contração muscular. O tecido muscular possui como características funcionais fundamentais contractilidade, excitabilidade, extensibilidade e elasticidade. Tem a capacidade de gerar forças mecânicas que tornam possível a locomoção, manipulação de objetos, circulação de sangue e propulsão dos alimentos através do tubo digestivo.¹⁴ Existem diferenças nos tecidos musculares que condicionam a classificação dos mesmos, segundo a sua morfologia, função e constituição. É um tecido que possui a capacidade de adaptação a diferentes condições fisiopatológicas através da regulação de vias responsáveis pela síntese proteica e renovação celular.^{24,25}

Os microfilamentos e proteínas associadas geram as forças necessárias para a contração celular.¹⁴ A contração muscular é consubstanciada pelo deslizamento de dois conjuntos de filamentos de actina e miosina.²⁶ A contração muscular resultante das interações cíclicas de actina e miosina resultam na libertação de energia sob a forma de adenosina trifosfato (ATP) e calor.²⁷

De acordo com as características morfológicas e funcionais, distinguem-se três tipos de tecido muscular: músculo estriado esquelético, músculo estriado cardíaco e músculo liso.^{14,25} O músculo estriado cardíaco, cujas células apresentam estriação transversal, é formado por células alongadas e ramificadas, que possuem uma disposição paralela com união através de discos intercalares, encontrados exclusivamente no músculo cardíaco.²⁸ A contração das células musculares cardíacas é involuntária, vigorosa e rítmica.²⁵ O músculo liso desempenha contrações rítmicas de baixa intensidade e de longa duração. É formado por aglomerados de células fusiformes que não apresentam estriação. Constitui a componente muscular das estruturas viscerais, vasos sanguíneos, trato gastrointestinal, útero e bexiga. A sua contração involuntária é dependente do sistema nervoso autónomo e do sistema endócrino. O músculo esquelético é o tecido mais abundante no corpo humano, acompanhado por ossos, cartilagens e tendões que constituem os meios de locomoção, mas também desempenha um papel importante na homeostasia metabólica.^{14,25} Encontra-se revestido por uma lâmina delgada de tecido conjuntivo, o perimísio, que se prolonga para

interior da estrutura muscular, e o divide em feixes (primários, secundários, terciários). Os septos intramusculares de tecido conjuntivo que condicionam os feixes constituem o endomísio.^{14,28} O músculo esquelético é composto por feixes de células multinucleadas de diâmetro variável, cilíndricas, alongadas, que apresentam estriação.²⁵ A sua contração é rápida, forte, e sob controlo voluntário, causada pela interação de finos filamentos de actina sobre filamentos espessos de miosina, cuja configuração molecular permite o deslizamento de uns sobre os outros. As fibras musculares, dispostas paralelamente e separadas por tecido conjuntivo rico em colagénio, agrupam-se em feixes que adotam a direção de ação do músculo que constituem.^{14,25,27} As miofibrilhas que conferem estriação ao músculo esquelético e ocupam a maioria do espaço intracelular, condicionam a posição periférica dos núcleos e mitocôndrias; são constituídas por unidades que se repetem ao longo de seu comprimento, denominadas sarcómeros. Em torno do conjunto de miofibrilhas de uma fibra muscular situa-se o retículo sarcoplasmático (retículo endoplasmático liso), especializado no armazenamento de cálcio.^{14,29}

As faixas mais extremas e mais claras do sarcómero, designadas de bandas I, contêm apenas filamentos de actina. Nesta zona encontra-se a linha Z, que corresponde a várias uniões entre dois filamentos de actina. A faixa central, mais escura, designa-se de banda A, cujas extremidades são formadas por filamentos de actina e miosina sobrepostos. Na banda A é possível identificar uma região mediana mais clara, a banda H, constituída apenas por miosina. O sarcómero compreende o segmento entre duas linhas Z consecutivas e é a unidade contrátil da fibra muscular.^{14,25} A contração do músculo esquelético ocorre pelo deslizamento dos filamentos de actina sobre os de miosina. Nas extremidades dos filamentos de miosina existem pequenas projeções capazes de formar ligações locais específicas dos filamentos de actina, quando o músculo é estimulado. Durante a contração muscular, o sarcómero diminui de comprimento com aproximação de duas linhas Z, chegando mesmo a desaparecer a zona H na contração máxima. A energia para a contração muscular é fornecida por moléculas de ATP produzidas durante a respiração celular. Quando não existe energia suficiente, a miosina mantém-se unida à actina, provocando o espasmo muscular.^{14,27}

De acordo com sua estrutura e composição molecular, as fibras musculares esqueléticas podem ser identificadas como fibras do tipo I, ou de contração lenta e, fibras do tipo II, ou de contração rápida. As fibras do tipo I apresentam coloração vermelha escura por um sarcoplasma rico em mioglobina. Essas fibras são adaptadas para a contração mantida, continuada. As fibras do tipo II são adaptadas para contrações rápidas e descontínuas. Possuem pouca mioglobina o que lhes confere uma coloração mais pálida. As fibras do tipo II podem ser subdivididas nos tipos IIA, IIB e IIC, de acordo com as suas características funcionais e bioquímicas. As fibras do tipo IIB são as mais rápidas e dependem principalmente da glicólise como fonte de energia.¹⁴ Cada músculo, enquanto unidade anatômica, apresenta diferentes proporções destes tipos de fibras, dependente da sua localização corporal e da função que desempenha.¹⁴

Músculos mastigadores

Os músculos mastigadores permitem a realização dos movimentos do aparelho estomatognático, entre os quais os da mastigação e têm origem no crânio e inserem-se na mandíbula. Os músculos mastigadores são: o temporal, o masseter (ambos músculos elevadores da mandíbula), o pterigoideu medial e o pterigoideu lateral. Embriologicamente são derivados do primeiro arco branquial, innervados pelo nervo trigêmeo (V par craniano), através do nervo mandibular. São irrigados por ramos da artéria maxilar.³⁰

O músculo temporal tem origem na fossa temporal e a sua inserção é na porção anterior do ramo mandibular e na apófise coronóide. O músculo temporal tem como função elevar e retrair a mandíbula. O músculo pterigoideu lateral tem origem na apófise e grande asa do esfenóide com inserção na apófise condiliana do disco articular, com a função de projeção e depressão da mandíbula. O músculo pterigoideu medial tem origem na apófise pterigoideia do osso esfenóide e tuberosidade maxilar com inserção na face interna da mandíbula, com a função de projeção e elevação da mandíbula.^{15,29}

O músculo masseter tem como função a elevação e projeção da mandíbula. É um músculo espesso e apresenta uma forma retangular; apresenta dois feixes com fibras com

diferentes orientações: um feixe superficial e um profundo. O feixe superficial tem origem nos dois terços anteriores do arco zigomático e o feixe profundo na superfície média do arco zigomático. Os dois feixes inserem-se na superfície lateral externa do ramo e ângulo da mandíbula, que se estendem do arco zigomático ao ramo da mandíbula. A sua face medial relaciona-se com o ramo da mandíbula e as suas estruturas associadas, superiormente relaciona-se com o músculo temporal e anteriormente com o músculo bucinador. A face lateral do músculo masseter está coberta posteriormente pela glândula parótida e a sua fáscia, anteriormente pela fáscia massetéica. Esta face é cruzada pelo ducto parotídeo, pela artéria transversa facial e pelos ramos terminais do nervo facial. O músculo masseter é irrigado pela artéria massetéica, ramo da artéria maxilar e drenado posteriormente por veias massetéicas, que seguem o trajeto inverso da artéria. A inervação é feita pelo nervo massetéico, um ramo do nervo mandibular.^{30,31}

O etanol

O etanol é uma substância depressora do SNC e afeta a presença e ação de diversos neurotransmissores no cérebro, entre eles, o ácido gama-aminobutírico (GABA) e o glutamato^{32,33}.

É uma substância absorvida principalmente no intestino delgado e em menores quantidades no estômago e no cólon. Acompanha os movimentos da água, de modo que difunde em todos os tecidos, com exceção de ossos e tecido adiposo.³⁴ É uma molécula que atravessa facilmente a membrana celular, pelo que o equilíbrio de concentrações entre o sangue e os tecidos é atingido rapidamente.³⁴ A velocidade de absorção aumenta com o rápido esvaziamento gástrico e com a ausência de proteínas, lípidos ou hidratos de carbono que interfiram com a absorção. A intoxicação pelo álcool, especialmente em pessoas subnutridas ou em jejum, pode causar hipoglicémia.³⁵

O etanol é metabolizado, principalmente pelo fígado, através de três vias metabólicas. A mais importante tem lugar no citosol: o etanol é oxidado em acetaldeído por ação da desidrogenase alcoólica (ADH). O acetaldeído é depois convertido em acetato (no citosol ou nas

mitocôndrias) por ação da aldeídesidrogenase. Cada uma destas reações requer NAD⁺, com aumento da relação NADH/NAD⁺. Outra via de metabolização do etanol é microsossomal.^{33,36,37} Esta via é ativada quando há um consumo excessivo de álcool. Este sistema tem como co-fator NADPH e utiliza o citocromo P450 (CYP3E1), a NADPH- citocromo redutase e fosfolípidos. Esta via utiliza o oxigênio e a NADPH não gerando componentes formadores de energia, mas antes consome energia. A terceira via de metabolização do etanol ocorre no interior dos peroxissomas, através das catalases.^{33,37} Todas as vias metabólicas do etanol têm como produto final o acetaldeído, responsável pelos efeitos adversos do etanol no organismo: aumento significativo da geração de espécies reativas de oxigênio e diminuição da função mitocondrial.^{38,39}

As repercussões metabólicas do etanol mais relevantes, decorrem na alteração da oxidação-redução com a modificação da relação NAD⁺/ NADH.^{39,40} Um dos efeitos desse desequilíbrio metabólico é a diminuição da gliconeogénese por impedir a oxidação do lactato a piruvato, que se manifesta sob a forma de hipoglicémia.⁴¹ (A acumulação de ácido láctico pode atingir níveis excessivos e interferir na excreção de ácido úrico, competindo pelo mecanismo de transporte no túbulo renal e assim precipitar um ataque de gota em indivíduos susceptíveis.^{41,42} O excesso de NADH inibe a oxidação de ácidos gordos, com acumulação hepática de lípidos, que se manifesta sob a forma de esteatose hepática.^{42,43}

O etanol inibe a formação de acetil-CoA, inibe o ciclo do ácido cítrico ao inibi a α -cetoglutarato.³⁸ A diminuição de ATP tem consequências importantes na célula, pois interfere com a integridade da membrana, funcionamento de bombas iónicas, síntese proteica.¹⁴ A produção de citocinas (por células de Kupffer e outras células do fígado) e espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos ativados e através do efeitos do metabolismo do etanol desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão da doença hepática. As ROS promovem a formação de produtos de peroxidação de lípidos, o que resulta num desequilíbrio do equilíbrio oxidativo, conduzindo assim a alterações estruturais e funcionais dos hepatócitos.⁴⁴

Objetivos

O objetivo do presente trabalho é procurar reconhecer os efeitos sobre a composição atómica, nomeadamente em relação aos elementos químicos alumínio, fósforo, enxofre, cloro, potássio, cálcio e ferro dos músculos mastigadores, num modelo experimental de alcoolismo.

Pretende-se avaliar de forma comparativa a patologia identificável do ponto de vista morfológico com a deteção/quantificação dos referidos elementos químicos.

Materiais e Métodos

Preparação e distribuição dos animais

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram utilizados 20 ratos Wistar macho, com oito semanas de idade no início do ensaio, mantidos em condições padrão de manipulação e manutenção, de acordo com a legislação em vigor. Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos com igual número de indivíduos: o grupo controlo mantido com acesso a água e comida ad libitum e o grupo teste com acesso livre a biberão de bebida com uma solução de etanol a 5% .

Sacrifício, colheitas e registos

Todos os animais foram sacrificados findo o período experimental de oito semanas, por sobredosagem anestésica. Foi realizada a necrópsia completa de cada um dos indivíduos, com recolha de fragmentos para análise histológica e para congelação a -80°C. Na necrópsia foram registados os dados referentes à observação do hábito externo, observação detalhada do hábito interno e fragmentos de tecidos colhidos e respectiva finalidade, em modelo próprio em utilização no Serviço de Patologia Experimental.

Histologia

Em todos os animais foram colhidos para histologia de rotina fragmentos do músculo masseter, tendo sido a fixação realizada com recurso a formaldeído neutro tamponado a



Figure 1: Equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.

10%. Todos os fragmentos colhidos para histopatologia foram incluídos em parafina, tendo sido realizados cortes de cerca quatro micrómetros de espessura para coloração de rotina de Hematoxilina e Eosina.

Análise de fluorescência de raios-X (XRF)

De todos os animais foram colhidos fragmentos de músculo masseter e conservados a -80°C .

A técnica de análise de fluorescência de raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX Figura 1) consiste em fazer incidir o feixe de raio-X colimado (com uma área de $0,5 \times 0,5\text{mm}$), com energia de 15 keV e com tempo de exposição de 200s a cada uma das amostras (Figura 2). A energia de 15 keV tem capacidade de detectar elementos atômicos.

Nos espectros obtidos, foi removida a radiação de fundo, permitindo a análise individual com quantificação da presença de alumínio (Al), fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio

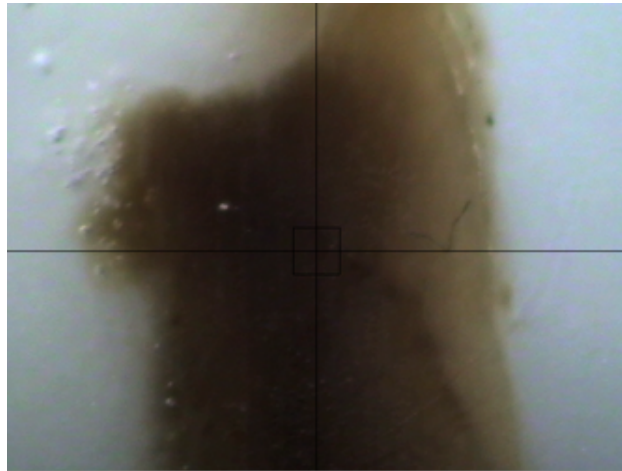


Figure 2: Ilustração do local de incidência do feixe de raio-X. Fonte: imagem fotografada pelo autor.

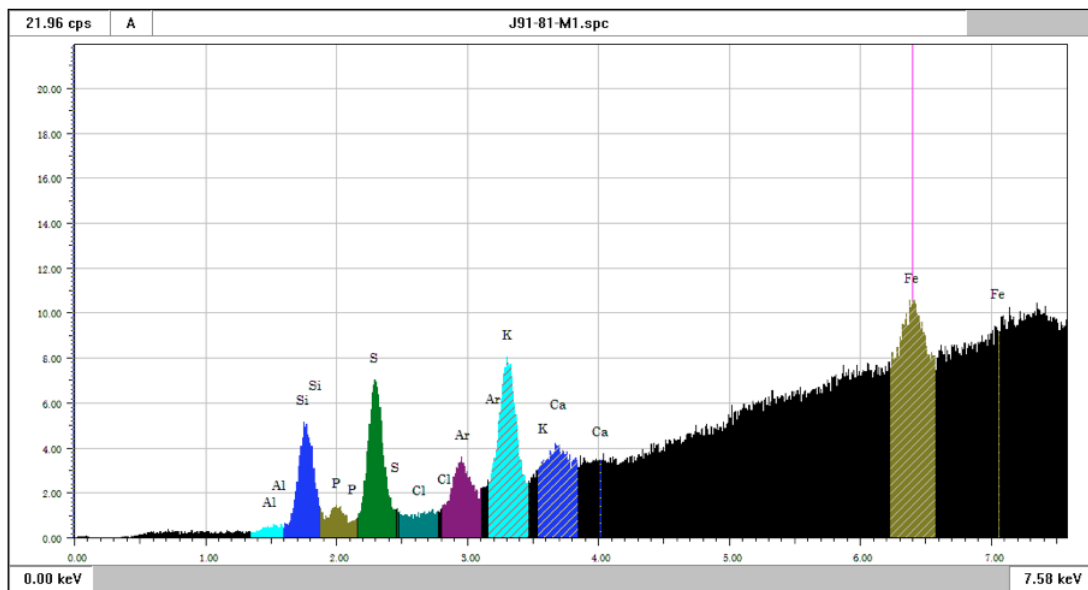


Figure 3: Gráfico do espectro de energias criado pelo software do equipamento de análise por Fluorescência de Raios-X (Hitachi modelo SEA 6000VX) Fonte: imagem fotografada pelo autor.

(K), cálcio (Ca) e ferro (Fe) (Figura 3).

Análise estatística

A análise estatística foi feita com o programa estatístico R. O programa R é uma aplicação de distribuição livre dedicado á estatística computacional e gráfica. Este programa utiliza a linguagem R (o mesmo nome do programa), derivada da linguagem S criada no laboratórios Bell, pertencendo actualmente á Lucent Technologies. O R fornece várias recursos estatísticos (modelos lineares, modelos não lineares, testes estatísticos, análises de séries no tempo, “clustering”,...), ferramentas gráficas e programação orientada a objectos, podendo ser estendido através da instalação de módulos.

As funções utilizadas no programa R para o cálculo da média e do desvio padrão foram a função `mean()` e a função `sd()`, respectivamente. A função `mean()` calcula uma média aritmética a partir de um vetor que recebe como argumento, implementando a (equação 1), onde μ é a média, n o número de amostras e n_i amostra de índice i . A função `sd()` calcula o desvio padrão de um vetor que recebe como argumento, implementado a equação (equação 2), onde σ é o desvio padrão, N o número da amostra, μ a média e x_i a amostra de índice i .

$$\mu = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n n_i \quad (1)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2} \quad (2)$$

Para calcular os teste *t*-Student, utilizou-se a função `ttest()`. Esta função recebe dois vectores como argumentos, mantendo-se as opções por defeito que são: teste de duas caudas, correcção de *Welch* para a não homogeneidade da variância e intervalo de confiança de 95%. O teste *t* de *Welch* é definido pela seguinte fórmula:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}} \quad (3)$$

onde \bar{X} é a média da amostra, s^2 é a variância da amostra e N o tamanho da amostra.

Resultados

O valor médio das contagens por segundo para o Al foi de $0,70 \pm 0,63$ no grupo controlo e de $0,47 \pm 0,55$ no grupo teste, não evidenciado uma diferença estatisticamente significativa. O P mostrou um valor médio de contagens por segundo de $8,76 \pm 3,70$ no grupo controlo, diminuído em relação ao grupo teste $18,10 \pm 11,91$, evidenciando uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0018$). O S mostrou um valor médio de contagens por segundo de $85,04 \pm 12,14$ no grupo controlo, com valores diminuídos em relação ao grupo teste $107,32 \pm 18,92$, evidenciando uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O valor médio das contagens por segundo para o Cl foi de $0,18 \pm 0,52$ no grupo controlo e de $14,44 \pm 10,25$ no grupo teste, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O K mostrou um valor médio de contagens por segundo de $51,15 \pm 31,54$ no grupo controlo, aumentado em relação ao grupo teste para $1,58 \pm 0,83$, evidenciando uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O Ca obteve um valor médio de contagens por segundo de $30,03 \pm 4,80$ no grupo de controlo e $27,95 \pm 14,21$ no grupo de teste, não evidenciada uma diferença estatisticamente significativa. Por último o Fe obteve os valores de $29,32 \pm 8,84$ no grupo de controlo e $22,57 \pm 11,30$ no grupo de teste, evidenciada uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,027$).

O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/K foi de $0,32 \pm 0,50$ no grupo de controlo e de $0,02 \pm 0,02$ no grupo de teste, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,008$). O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre P/K foi de $15,36 \pm 12,46$ no grupo de controlo e de $0,22 \pm 0,12$ no grupo de teste, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O rácio médio

Table 1: Média e desvio padrão das contagens por segundo obtidas nos grupos controle e teste, com a respetiva significância estatística (valor de p).

Elementos	Controlo	Teste	valor de p
Al	0,70 ± 0,63	0,47 ± 0,55	0,123
P	8,76 ± 3,69	18,10 ± 11,91	0,001
S	85,04 ± 12,14	107,32 ± 18,92	<0,0001
Cl	0,18 ± 0,52	14,44 ± 10,25	<0,0001
K	51,15 ± 31,54	1,58 ± 0,83	<0,0001
Ca	30,04 ± 4,80	27,95 ± 14,21	0,28
Fe	29,32 ± 8,84	22,57 ± 11,30	0,027

do valor médio das contagens por segundo entre S/K no grupo de controlo foi de $86,20 \pm 37,98$ e no grupo de teste foi de $2,54 \pm 1,64$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/K foi de $10,98 \pm 7,81$ no grupo de controlo e de $0,01 \pm 0,03$ no grupo de teste, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/K no grupo de controlo foi de $23,46 \pm 18,01$ e no grupo de teste foi de $0,91 \pm 0,74$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O rácio médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/K no grupo de controlo foi de $18,94 \pm 13,88$ e no grupo de teste foi de $1,00 \pm 0,98$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,00001$). Relativamente ao rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/P no grupo de controlo foi de $0,03 \pm 0,03$ e no grupo de teste foi de $0,01 \pm 0,13$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,04$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre S/P no grupo de controlo foi de $8,40 \pm 4,66$ e no grupo de teste foi de $12,14 \pm 7,67$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/P no grupo de controlo foi de $1,13 \pm 1,02$ e no grupo de teste foi de $0,03 \pm 0,09$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

RESULTADOS

O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre K/P no grupo de controlo foi de $0,15 \pm 0,17$ e no grupo de teste foi de $6,29 \pm 3,82$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/P no grupo de controlo foi de $2,46 \pm 2,13$ e no grupo de teste foi de $4,80 \pm 5,10$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/P no grupo de controlo foi de $1,54 \pm 0,69$ e no grupo de teste foi de $5,01 \pm 6,34$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,011$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Al/S no grupo de controlo foi de $0,004 \pm 0,005$ e no grupo de teste foi de $0,008 \pm 0,007$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre P/S no grupo de controle foi de $0,16 \pm 0,09$ e no grupo de teste foi de $0,10 \pm 0,04$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,009$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Cl/S no grupo de controle foi de $0,13 \pm 0,08$ e no grupo de teste foi de $0,01 \pm 0,01$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre K/S no grupo de controle foi de $0,01 \pm 0,008$ e no grupo de teste foi de $0,60 \pm 0,37$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Ca/S no grupo de controle foi de $0,27 \pm 0,15$ e no grupo de teste foi de $0,36 \pm 0,09$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,02$). O rácio entre médio do valor médio das contagens por segundo entre Fe/S no grupo de controle foi de $0,21 \pm 0,11$ no grupo de teste foi de $0,36 \pm 0,14$, evidenciado uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0005$).

Na Figura 4 esta representada a distribuição dos valores obtidos para os elementos P, S e K no grupo de teste e grupo de controlo.

Table 2: Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo controle.

Elementos	/K	/P	/S
Al	0,32± 0,49	0,03± 0,03	0,004± 0,005
P	15,36± 12,46	-	0,16± 0,09
S	86,20± 37,98	8,40± 4,66	-
Cl	10,98± 7,81	1,13± 1,02	0,13 ± 0,09
K	-	0,15 ±0,17	0,02 ± 0,01
Ca	23,45± 18,01	2,46± 2,13	0,27± 0,15
Fe	18,94± 13,88	1,54± 0,69	0,21± 0,11

Table 3: Média e desvio padrão obtidos a partir dos coeficientes entre os vários elementos e o potássio, fósforo e enxofre no grupo teste.

Elementos	/K	/P	/S
Al	0,022± 0,024	0,10± 0,03	0,008± 0,007
P	0,23 ±0,12	-	0,10± 0,04
S	2,54 ±1,64	12,14± 4,66	-
Cl	0,01 ±0,03	0,03 ±1,02	0,002± 0,006
K	-	6,29± 0,17	0,60± 0,37
Ca	0,91 ±0,74	4,80± 2,13	0,36 ±0,07
Fe	1,00± 0,98	5,01± 0,69	0,36± 0,14

RESULTADOS

Table 4: Valores de p obtidos a partir dos coeficientes dos vários elementos com o potássio, fósforo e enxofre, entre o grupo controle e teste.

Elementos	/K	/P	/S
Al	0.0254	0.0087	0.0082
P	0.0088	-	<0,0001
S	<0,0001	0.040	-
Cl	<0,0001	<0,0001	<0,0001
K	-	<0,0001	<0,0001
Ca	0.020	0.037	<0,0001
Fe	0.0005	0.0116	<0,0001

Table 5: Alteração dos elementos - Conclusão.

Elementos	Controlo	Teste
Al	Normal	↑
P	Normal	↓
S	Normal	↓
Cl	Normal	↓
K	Normal	↑
Ca	Normal	=
Fe	Normal	↑

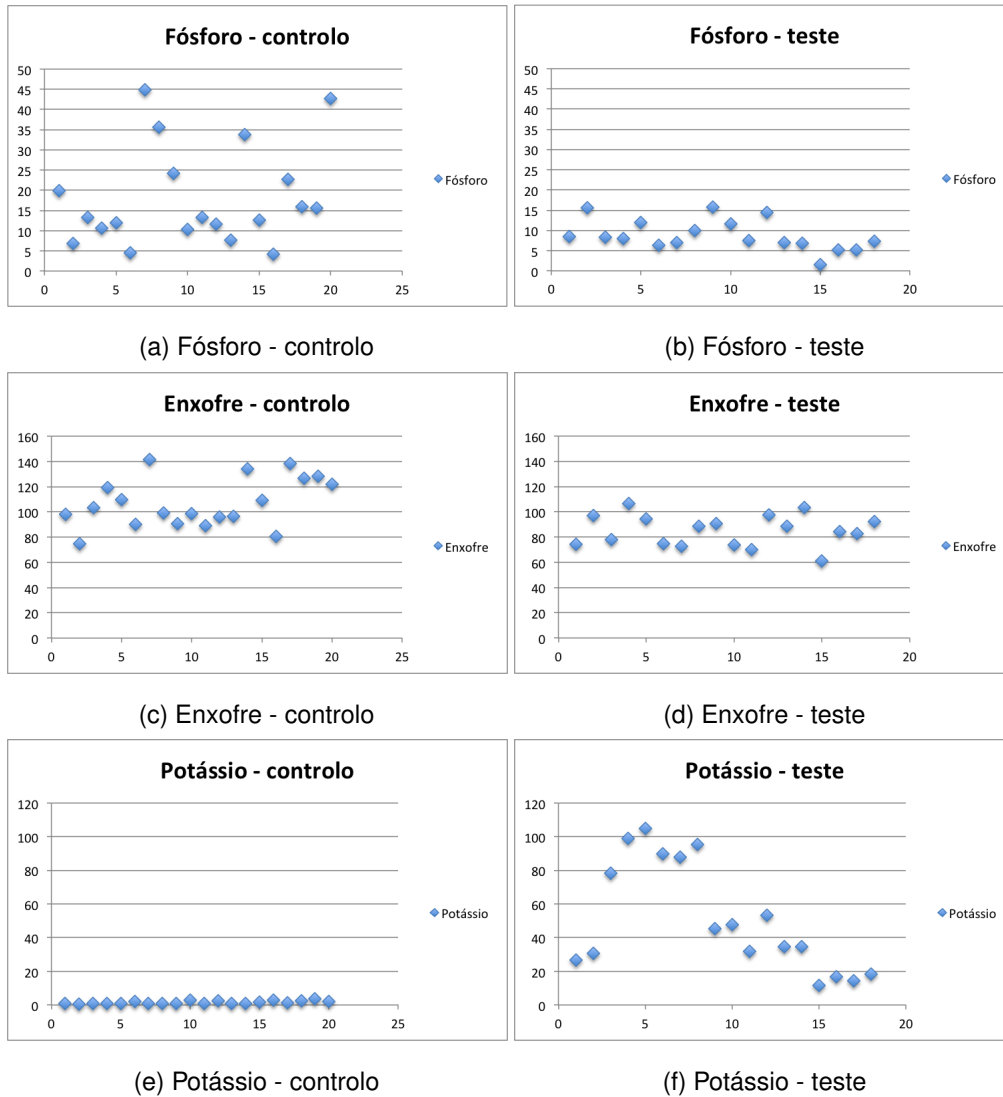


Figure 4: Distribuição dos resultados dos elementos P, S e K do grupo de controlo (esquerda) e do grupo de teste (direita).

Discussão

A análise de fluorescência de raios-X permite a identificação de quase todos os elementos da tabela periódica. Elementos com número atómico inferior a 11 (sódio) apresentam energias de emissão de raios-X características inferiores a 1 keV, não detectáveis na maioria dos equipamentos. As vantagens principais deste método de identificação são o facto de não ser destrutivo, não ser necessário tratamento prévio de amostra, é seguro, rápido, simples, e permite a identificação de vários elementos numa só medida, em amostras sólidas, líquidas ou gasosas. A grande limitação da técnica de Fluorescência de Raios-X será a complexidade da interpretação dos espectros bem como a quantificação da abundância de cada elemento. Em amostras irregulares e com distribuição elementar heterogénea, torna-se impossível uma determinação quantitativa.

A radiação de fundo também pode ser considerada uma desvantagem, pois está sempre presente em cada determinação. Esta consiste numa emissão de radiação pelos elementos constituintes do equipamento, da fonte de Raios-X e plataformas de colocação de amostra.

Para energias mais baixas, como o exemplo dos 15 keV utilizou-se o gás inerte hélio (He), para que interferências relativas ao ar atmosférico, especificamente do gás árgon (Ar), sejam anuladas. A análise comparativa dos espetros elementares do músculo masseter nos animais do grupo controlo e do grupo teste permite observar alterações da composição atómica entre os dois grupos, em particular do alumínio, fósforo, enxofre, cloro, potássio e ferro.

O enxofre é o átomo que tem o número atómico 16 e apresenta 32 uma, encontrando-se no estado sólido à temperatura ambiente, sendo insolúvel em água. É um elemento muito

importante para todos os seres vivos. No caso do corpo humano este elemento encontra-se com muita frequência na constituição de compostos orgânicos integrando moléculas de alguns aminoácidos. A sua presença é essencial para a construção de proteínas. Podemos encontrar este elemento em vários alimentos como: verduras, frutas, carne, leite, alho. O sistema ferro-enxofre (Fe-S) interfere com proteínas envolvidas em processos celulares fundamentais, tais como a transferência de elétrons em mitocôndrias, formação de ribossomas e replicação e reparação de DNA.^{3,45} O álcool suprime a síntese de proteínas e sinalização mediada por mTORC1.^{4,46}

O potássio é o átomo que possui o número atômico 19 e tem 39 uma. É um metal alcalino, no estado sólido à temperatura ambiente, com uma estrutura cristalina no sistema cúbico. Cerca de 98% do potássio do corpo humano é intracelular. Os iões K^+ e Na^+ são mantidos na célula essencialmente pela bomba de sódio potássio. Os iões K^+ são transportados para o interior da célula e os iões Na^+ são transportados para o seu exterior. Uma diminuição da concentração extracelular dos iões K^+ aumenta a diferença da concentração entre o interior e o exterior da célula, aumentando assim o gradiente de concentração dos iões K^+ , com maior tendência de difusão destes iões para o espaço extracelular e com necessidade de uma maior carga negativa no interior da célula para contrariar à difusão esta difusão de potássio. A maioria das células animais contém elevadas concentrações de potássio e baixas concentrações de sódio em relação ao meio externo. Com a indução de álcool há um excesso de NADH e conseqüente diminuição de ATP, energia esta que controla o equilíbrio da bomba de transporte ativo de sódio/potássio. Este desequilíbrio celular implica a perda da homeostase celular e conseqüente aumento da concentração de potássio intracelular. O ADH aumenta a força propulsora eletroquímica para a saída de potássio através da membrana luminal das células principais do túbulo renal a partir da estimulação da captação de sódio através da mesma. O aumento na captação de sódio reduz a diferença de potencial elétrico através da membrana luminal. Apesar desse efeito, a hormona anti-diurética (ADH) diminui o fluxo tubular renal, estimulando a reabsorção de água, com diminuição conseqüente da secreção de potássio. O efeito inibidor do fluxo tubular reduzido compensa o efeito estimulador da ADH sobre o gradiente eletroquímico favorável à saída de

potássio através da membrana luminal. O etanol faz com que haja uma redução de ADH, que resulta no aumento da retenção de potássio e diminuição de cloro intracelular. O cloro tem como principal função a manutenção do equilíbrio químico com os cátions presentes. O cloro participa ainda nos efeitos tampão do sangue em intercâmbio com o bicarbonato.

O alumínio é o átomo que possui o número atômico 13 e tem 37 uma. É o metal mais abundante e o terceiro elemento mais comum da crosta terrestre. Devido à sua baixa solubilidade e porque se deposita como um sedimento (hidroxiapatite de alumínio), apenas pequenas quantidades de alumínio são encontradas em solução na água (0,1-0,4%). A biodisponibilidade oral de alumínio é aumentada por citrato, pH ácido, e urémia e pode ser diminuída pela presença de silício.¹ A biodisponibilidade oral de alumínio a partir de hidróxido de alumínio é $\leq 0,1\%$. O alumínio está presente em alguns alimentos e estima-se que a ingestão normal deste elemento deva rondar os 4-9 mg/dia . Cerca de 60, 25, 10, 3 e 1% do peso de corpo de alumínio está presente no osso, pulmão, músculo, fígado e cérebro, respetivamente. No presente estudo observou-se um aumento da concentração relativa de alumínio na ingestão experimental de etanol. Nos músculos, sabe-se que o consumo de álcool provoca inflamação, degenerescência e atrofia de fibras musculares, particularmente do tipo II, por vezes com necrose.² O alumínio no organismo esta intimamente ligado ao ferro, o que também justifica o aumento deste no organismo. Em média, apenas 4% da quantidade total de alumínio ingerido é absorvido pelo intestino, sendo depois armazenado no osso, o seu principal reservatório corporal. Todas a etapas metabólicas do etanol necessitam de NAD⁺. Quantidades pequenas de etanol são excretadas na urina e o metabolismo em acetato é responsável pela excreção de 90-98% do etanol ingerido, principalmente devido ao metabolismo hepático pela ADH e pela ADLH.³

O ferro é um átomo com número atômico 26 e 56 uma. Encontra-se na natureza no estado sólido. Na dieta pode ser encontrado na carne, gema de ovo e leguminosas. O ferro participa no transporte de oxigénio e dióxido de carbono pelo sangue, como constituinte da hemoglobina. É um importante constituinte de enzimas e fundamental para o desenvolvimento físico e intelectual, bem como para a capacidade de defesa do organismo perante o risco de infeções.

O fósforo é um átomo que possui o número atômico 15 e tem 31 uma. É um não-metal. Cerca de 5% do fosfato existente no organismo encontra-se no osso e dente, sob a forma de hidroxiapatite, e o restante encontra-se no interior das células. Constitui um componente importantes do ADN, ARN e ATP. Muitos dos iões fosfato asseguram ligações covalentes com outras moléculas orgânicas. O consumo de álcool implica uma diminuição do ião fosfato no organismo sob a forma de sais fosfato.

O cálcio é um átomo que possui o número atômico 20 e tem 40 uma. É um metal da família dos alcalinos terrosos. Está presente no leite e derivados, frutos secos e alguns legumes. Participa na constituição do tecido ósseo e dentes. Intervém em diversas funções orgânicas e na contração muscular. A contração muscular é ativada por uma elevação abrupta no nível de cálcio no citosol. O relaxamento muscular depende da rápida acumulação de cálcio no retículo sarcoplasmático. O etanol provoca atrofia do tecido muscular.⁴⁷ No entanto ao haver uma compensação com a alteração da quantidade e qualidade da dieta ingerida que compense e eventualmente anule a acção do etanol sobre o músculo esquelético.⁴⁶

Para funcionarem perfeitamente, as células necessitam de um meio ambiente constante. Para um bom funcionamento celular, é necessário manter o meio interno constante. O termo homeostase define as condições de equilíbrio, que são mantidas por processos fisiológicos coordenados. Alguns mecanismos de controlo homeostático são aqueles responsáveis pela manutenção das concentrações normais dos elementos sanguíneos, da temperatura corporal, do volume e pH dos líquidos corporais, da pressão arterial e da frequência cardíaca.

Conclusões

A realização do presente trabalho permite observar alterações da constituição elemental dos músculos mastigadores num modelo experimental de alcoolismo. A comparação entre o grupo de controlo relativamente ao grupo de teste permitiu verificar um aumento da concentração relativa de alumínio, potássio e ferro; diminuição do fósforo, enxofre e cloro e manutenção da concentração de cálcio inalterada entre os dois grupos.

Todos os indivíduos submetidos à ingestão experimental de etanol não apresentaram alterações morfológicas do músculo masseter, o que leva a pensar que neste modelo, à data do sacrifício, existem apenas alterações elementais deste músculo mastigador.

Este estudo deve ser completado com outros estudos comparando o que acontece noutros músculos nas mesmas condições experimentais, nomeadamente músculos da respiração e músculos da marcha. É também muito importante avaliar e comparar outras condições de alcoolismo e tentar perceber da possível reversibilidade destas alterações.

Referências Bibliográficas

- [1] S. Chowdhury, “Big Bang Nucleosynthesis and Formation of Elements in Stars Emergence of Matter from Energy after Big Bang,” no. 1916.
- [2] N. Alfredo and J. Bandeira, “NUCLEOSSÍNTESE,” *Universidade Federal Fluminense*, 2006.
- [3] P. O. K. Krehl, “History of shock waves, explosions and impact: A chronological and biographical reference,” p. 1310, 2008.
- [4] J. L. Adcock, “Chemistry 531 Chemistry Of the Elements,” no. chapter 1, Origin of the Elements. Isotopes and Atomic Weights, pp. 1–19, 1990.
- [5] J. Lochner, G. Rohrbach, and K. Cochrane, “What is Your Cosmic Connection to the Elements ? IMAGINE THE UNIVERSE !,” *National Aeronautics and Space Administration*, 2005.
- [6] J. Glanz, “Astronomy and Cosmology : Big Bang Theory and Modern Quantum mechanical phenomena are not comprehensible via concepts and assumptions derived from the macroscopic world. For example, the daily experience that things have a definitive property, are located ,” pp. 11–19, 1955.
- [7] E. M. Burbidge, G. R. Burbidge, W. a. Fowler, and F. Hoyle, “Synthesis of the elements in stars,” *Reviews of Modern Physics*, vol. 29, no. 4, pp. 547–650, 1957.
- [8] S. Sarkar, “Big Bang Nucleosynthesis: Reprise,” no. September, p. 23, 1999.
- [9] G. Wallerstein, I. Iben, P. Parker, A. Boesgaard, G. Hale, A. Champagne, C. Barnes, F. Käppeler, V. Smith, R. Hoffman, F. Timmes, C. Sneden, R. Boyd, B. Meyer, and D. Lambert, “Synthesis of the elements in stars: forty years of progress,” *Reviews of Modern Physics*, vol. 69, no. 4, pp. 995–1084, 1997.
- [10] F. Nielsen and J. Hunt, “Trace Elements Emerging as Important in Human Nutrition.”
- [11] world Health Organization, “Trace elements in human nutrition and health World Health Organization,” *WHO Library Catalogue*, pp. 1–160, 1996.

- [12] C. Shaw, S. Seneff, S. Kette, L. Tomljenovic, J. Oller, and R. Davidson, "Aluminum-Induced Entropy in Biological Systems: Implications for Neurological Disease," *Journal of Toxicology*, vol. 2014, pp. 1–27, 2014.
- [13] R. K. Gherardi, H. Eidi, G. Crépeaux, F. J. Authier, and J. Cadusseau, "Biopersistence and Brain Translocation of Aluminum Adjuvants of Vaccines," *Frontiers in Neurology*, vol. 6, no. February, pp. 1–8, 2015.
- [14] R. Seeley, T. Stephens, and P. Tate, "Anatomia e Fisiologia," 2003.
- [15] U. Trautvetter, N. Neef, M. Leiterer, M. Kiehntopf, J. Kratzsch, and G. Jahreis, "Effect of calcium phosphate and vitamin D₃ supplementation on bone remodelling and metabolism of calcium, phosphorus, magnesium and iron.," *Nutrition journal*, vol. 13, p. 6, 2014.
- [16] P. KONIECZYNSKI and M. WESOLOWSKI, "Phytate, inorganic and total phosphorus and their relations to selected trace and major elements in herbal teas," *Acta Poloniae Pharmaceutica*, vol. 71, no. 1, pp. 85–93, 2014.
- [17] S. KATSUMATA, H. MATSUZAKI, M. UEHARA, and K. SUZUKI, "Effects of Dietary Calcium Supplementation on Bone Metabolism, Kidney Mineral Concentrations, and Kidney Function in Rats Fed a High-Phosphorus Diet," *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, no. 61, pp. 195–200, 2015.
- [18] A. Calderwood, R. J. Morris, and S. Kopriva, "Predictive sulfur metabolism - a field in flux," *Frontiers in Plant Science*, vol. 5, no. November, pp. 1–10, 2014.
- [19] C. Carpenter and S. Payne, "Regulation of iron transport systems in Enterobacteriaceae in response to oxygen and iron availability," *J Inorg Biochem*, no. Abril, pp. 110–117, 2014.
- [20] A. Sheftel, O. Stehling, and R. Lill, "Iron-sulfur proteins in health and disease," *Trends in Endocrinology and Metabolism*, vol. 21, no. 5, pp. 302–314, 2010.

- [21] C. Li, Z. Weng, S. F. Doran, R. K. Srivastava, F. Afaq, S. Matalon, and M. Athar, "Chlorine induces the unfolded protein response in murine lungs and skin," *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, vol. 49, no. 2, pp. 197–203, 2013.
- [22] P. P. Balte, K. A. Clark, L. C. Mohr, W. J. Karmaus, D. V. Sickle, and E. R. Svendsen, "The immediate pulmonary disease pattern following exposure to high concentrations of chlorine gas," 2013.
- [23] L. Tandara and I. Salamunic, "Iron metabolism: current facts and future directions," 2012.
- [24] A. Bianco, E. Thomas, F. Pomara, G. Tabacchi, B. Karsten, A. Paoli, and A. Palma, "Alcohol consumption and hormonal alterations related to muscle hypertrophy: a review," *Nutrition & metabolism*, vol. 11, no. 1, p. 26, 2014.
- [25] L. Junqueira and J. Carneiro, "Histologia Básica," vol. 12^o edição, 2013.
- [26] W. Herzog, K. Powers, K. Johnston, and M. Duvall, "A new paradigm for muscle contraction," vol. 6, no. June, pp. 1–11, 2015.
- [27] A. Månsson, D. Rassier, and G. Tsiavaliaris, "Poorly Understood Aspects of Striated Muscle Contraction," *BioMed Research International*, vol. 2015, pp. 1–28, 2015.
- [28] C. Lindskog, J. Linné, L. Fagerberg, B. M. Hallström, C. J. Sundberg, M. Lindholm, M. Huss, C. Kampf, H. Choi, D. a. Liem, P. Ping, L. Våremo, A. Mardinoglu, J. Nielsen, E. Larsson, F. Pontén, and M. Uhlén, "The human cardiac and skeletal muscle proteomes defined by transcriptomics and antibody-based profiling," *BMC Genomics*, vol. 16, no. 1, p. 475, 2015.
- [29] S. Lourenço dos Santos, M. a. Baraibar, S. Lundberg, O. Eeg-Olofsson, L. Larsson, and B. Friguet, "Oxidative proteome alterations during skeletal muscle ageing," *Redox Biology*, vol. 5, pp. 267–274, 2015.
- [30] N. S. Norton, "Netter's Head and Neck Anatomy and Dentistry," pp. 242–253, 2007.
- [31] B. D. Gerard J. Tortora, "Corpo Humano : Fundamentos de anatomia e fisiologia," vol. 8 ed, 2012.

- [32] G. M. Shayakhmetova, L. B. Bondarenko, A. V. Matvienko, and V. M. Kovalenko, "Chronic alcoholism-mediated metabolic disorders in albino rat testes," *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 7, no. 3, pp. 165–172, 2014.
- [33] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, "Biochemistry," vol. 5th editio, 2004.
- [34] J.-P. Gouille and M. Guerbet, "[Pharmacokinetics, metabolism, and analytical methods of ethanol].," Apr. 2015.
- [35] A. G. B. Wanna, J. H. Noble, M. L. Carlson, H. Gifford, M. S. Dietrich, D. S. Haynes, and B. M. Dawant, "This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please c," *The Laryngoscope*, no. 317, pp. 2–31, 2014.
- [36] E. Ceni, T. Mello, A. Galli, E. Ceni, T. Mello, and A. Galli, "Pathogenesis of alcoholic liver disease : Role of oxidative metabolism," vol. 20, no. 47, pp. 17756–17772, 2014.
- [37] J. I. Beier and C. J. McClain, "Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease," *Biol Chem*, vol. 391, no. 11, pp. 1249–1264, 2010.
- [38] E. González-Reimers, "Alcoholism: A systemic proinflammatory condition," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 20, no. 40, p. 14660, 2014.
- [39] K. C. Zenki, B. H. M. Mussulini, E. P. Rico, D. L. de Oliveira, and D. B. Rosemberg, "Effects of ethanol and acetaldehyde in zebrafish brain structures: an in vitro approach on glutamate uptake and on toxicity-related parameters.," *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, vol. 28, no. 5, pp. 822–8, 2014.
- [40] S. Balaraman, J. D. Tingling, P.-C. Tsai, and R. C. Miranda, "Dysregulation of microRNA Expression and Function Contributes to the Etiology of Fetal Alcohol Spectrum Disorders," *Alcohol Research : Current Reviews*, vol. 35, no. 1, pp. 18–24, 2013.

- [41] H. Pownall, C. Rosales, B. Gillard, and A. Gotto, "Alcohol: A Nutrient with Multiple Salutary Effects," *Nutrients*, vol. 7, no. 3, pp. 1992–2000, 2015.
- [42] H. V. Maia, V. R. Mena Miranda, and River, "Acidosis láctica: algunas consideraciones," *Revista Cubana de Pediatr a*, vol. 72, pp. 183 – 193, 09 2000.
- [43] F. Alchab, L. Ettouati, Z. Bouaziz, A. Bollacke, J.-G. Delcros, C. G. Gertzen, H. Gohlke, N. Pinaud, M. Marchivie, J. Guillon, B. Fenet, J. Jose, and M. L. Borgne, "Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of substituted indeno[1,2-b]indoles as inhibitors of human protein kinase ck2," *Pharmaceuticals*, vol. 8, no. 2, p. 279, 2015.
- [44] H. Xing, K. Jia, J. He, C. Shi, M. Fang, L. Song, P. Zhang, Y. Zhao, J. Fu, and S. Li, "Establishment of the Tree Shrew as an Alcohol-Induced Fatty Liver Model for the Study of Alcoholic Liver Diseases," *Plos One*, vol. 10, no. 6, p. e0128253, 2015.
- [45] Y.-F. Han, H.-W. Huang, L. Li, T. Cai, S. Chen, and X.-J. He, "The cytosolic iron-sulfur cluster assembly protein mms19 regulates transcriptional gene silencing, dna repair, and flowering time in arabidopsis," *PloS one*, vol. 10, no. 6, p. e0129137, 2015.
- [46] J. L. Steiner, B. S. Gordon, and C. H. Lang, "Moderate alcohol consumption does not impair overload-induced muscle hypertrophy and protein synthesis," *Physiological reports*, vol. 3, no. 3, p. e12333, 2015.
- [47] V. R. Preedy, V. B. Patel, M. E. Reilly, P. J. Richardson, G. Falkous, and D. Mantle, "Oxidants, antioxidants and alcohol: implications for skeletal and cardiac muscle," *Front Biosci*, vol. 4, pp. e58–e66, 1999.