UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA LUIZA DE CARVALHO FELIPPINI

Estudo de metais pesados comumente utilizados na reabilitação oral: efeitos do zinco no epitélio adamantino, epitélio juncional, gengiva inserida e ligamento periodontal do rato, durante a lactação.

Ribeirão Preto

2011

ANA LUIZA DE CARVALHO FELIPPINI

Estudo de metais pesados comumente utilizados na reabilitação oral: efeitos do zinco no epitélio adamantino, epitélio juncional, gengiva inserida e ligamento periodontal do rato, durante a lactação.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Orientador:
Prof. Dr. Miguel Angel Sala Di Matteo

VERSÃO ORIGINAL

Ribeirão Preto
2011

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO DO TEOR TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Felippini, Ana Luiza de Carvalho

Estudo de metais pesados comumente utilizados na reabilitação oral: efeitos do zinco no epitélio adamantino, epitélio juncional, gengiva inserida e ligamento periodontal do rato, durante a lactação. Ribeirão Preto, 2011.

98 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Reabilitação Oral.

Orientador: Sala, Miguel Angel.

1. Zinco. 2. Periodonto. 3. Lactação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Luiza de Carvalho Felippini

Estudo de metais pesados comumente utilizados na reabilitação oral: efeitos do zinco no epitélio adamantino, epitélio juncional, gengiva inserida e ligamento periodontal do rato, durante a lactação.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Reabilitação Oral.
Área de Concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A Deus

Senhor Deus, dono do tempo e da eternidade, TEU é o hoje, o amanhã, o passado e o futuro. Mais uma etapa se encerra, o aprendizado abre novos horizontes. Agradecemos pela vida e pelo amor, pelas flores, pelo ar e pelo Sol, pela alegria. Que possamos viver cada dia com otimismo e bondade, abra o nosso ser a tudo o que é bom e a tudo o que é belo. Que o nosso espírito seja repleto de bênçãos e que a TUA presença se faça no meio de nós.

Obrigada por tudo.

Aos meus pais José Luiz e Inês

Às minhas irmãs Ana Carolina e Ana Cristina

Aos meus avós Melchiades e Josepha (in memoriam)

Por toda a dedicação e compreensão

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Miguel Angel Sala Di Matteo por todo o auxílio durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ruberval Armando Lopes por todo o apoio para a realização deste trabalho

Ao Prof. Dr. José Paulo Ribas por toda a colaboração e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos funcionários do Departamento de Materiais Dentários e Prótese da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Aos pós-graduandos e docentes do Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral.

A Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Mói Sacilotto, secretárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

FELIPPINI, A.L.C. Estudo de metais pesados comumente utilizados na reabilitação oral: efeitos do zinco no epitélio adamantino, epitélio juncional, gengiva inserida e ligamento periodontal do rato, durante a lactação. Ribeirão Preto, 2011. 98p. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

RESUMO

Há evidência de elementos metálicos causarem toxicidade sistêmica e local. Este trabalho teve como objetivo, avaliar os efeitos do zinco no epitélio adamantino, epitélio juncional, gengiva inserida e ligamento periodontal do 1º molar superior do rato, durante a lactação. Para tal, foram utilizados ratos com 1 dia de vida pós-natal, cujas mães receberam 300 mg de cloreto de zinco (ZnCl_2) por litro de água destilada no bebedouro (grupo tratado - T) e ratos cujas mães não receberam o ZnCl_2 (grupo controle - C), durante toda a lactação. Ao final de 21 dias, os filhotes foram sacrificados com sobredosagem anestésica. As cabeças foram separadas e fixadas em solução de “alfac” (álcool 80% - 85ml; formalina - 10ml e ácido acético - 5ml) incluídas em parafina e os cortes frontais seriados foram corados com hematoxilina e eosina. Os cortes foram focalizados ao microscópio de luz (100X), munido de uma câmara clara. Os núcleos das células dos tecidos estudados foram projetados sobre o papel com aumento final de 1000X e 50 núcleos de cada estrutura foram contornados com lápis preto para posterior medição dos diâmetros maior (D) e menor (d). Uma vez determinados os diâmetros, foram estimados os seguintes parâmetros cariométricos: diâmetro geométrico médio, relação D/d, perímetro, área, volume, relação entre volume e área, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno. Neste trabalho também foi utilizada uma grade impressa sobre papel. As imagens obtidas foram desenhadas sobre a grade. A grade pode ser usada tanto para contar pontos sobre uma determinada estrutura histológica bem como para contar intersecções entre duas estruturas contíguas, bastando para isso, no primeiro caso, considerar o número de pontos que caem sobre a estrutura em estudo, ou, no segundo caso, o número de vezes em que as superfícies vizinhas cortam a linha curva. Com a finalidade de se avaliar o volume citoplasmático, o volume celular, a relação núcleo/citoplasma, a densidade numérica celular, a relação superfície externa/camada basal, a espessura das camadas epiteliais e a densidade de superfície, foram utilizadas ora a contagem de pontos, ora o número de intersecções e aplicados às equações estereológicas apropriadas para cada uma dessas variáveis. Todos os dados colhidos foram submetidos à estatística não paramétrica – Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney. Os núcleos dos tecidos estudados mostraram valores diminuídos, após cariometria, para os diâmetros maior, menor e médio; perímetro, área, volume e relação volume/área. Estereologicamente foi possível observar, no epitélio juncional, epitélio adamantino e no epitélio da gengiva inserida, células menos volumosas, levando a um maior número de células por mm^3 de tecido. O ligamento periodontal também se apresentou desorganizado e com fibras de menor tamanho. Pode-se concluir que zinco trouxe alterações nos epitélios juncional e adamantino, gengiva inserida bem como no ligamento periodontal, após avaliações morfométricas e estereológicas.

Palavras - chave: zinco, periodonto, lactação.

FELIPPINI, A.L.C. Study of heavy metals commonly used in oral rehabilitation: effects of zinc over adamantine epithelium, junctional epithelium, inserted gum and periodontal ligament of the rat, during lactation. Ribeirão Preto, 2011. 98p. Thesis (Doctorate in Oral Rehabilitation). Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

ABSTRACT

There is evidence that metal elements cause systemic and local toxicity. The purpose of the present study is to evaluate zinc effects on the adamantine epithelium, junctional epithelium, inserted gum and periodontal ligament of the superior first molar of rat, during lactation. To do this, 1- day old rats were used, whose mothers received 300 mg of zinc chloride (ZnCl_2) per liter of distilled in the drinker (treated group – T) and rats whose mothers did not receive ZnCl_2 (control group – C), during lactation. After 21 days, the rat pups were killed with an anesthetic overdose. The heads were separated and fixed in an “alfac” solution (80% alcohol - 85ml, formaline - 10ml, and acetic acid - 5ml), embedded in paraffin and stained with hematoxylin and eosin. The cuts were viewed under a light microscope (100X) with a clear chamber. The nucleus of the studied tissue cells were projected on paper with a final increase of 1000X and fifty nuclei from each structure were outlined with a black pencil so that the greater (D) and smaller (d) diameters could be measured. After determining the diameters, the following cariometric parameters were established: mean geometric diameter, D/d relation, perimeter, area, volume, volume/area relation, eccentricity, form coefficient, and contour index. This study also used a grid printed on paper. The images obtained were drawn over the grid, which was used to count points over a certain histological structure as well as to count intersections between two contiguous structures. All that was needed, in the first case, was to consider the number of points located over the studied structure, or, in the second case, the number of times that neighboring surfaces cut the curve line. With the aim to evaluate the cytoplasmic volume, cellular volume, cytoplasm/nucleus relation, cellular numeric density, external surface/basal layer relation, the thickness of epithelial layers, and surface density, point counting was used at times and, at others, the number of intersections was considered and applied to the appropriate stereological equations for each variable. All the collected data were subjected to non - parametric statistics – Wilcoxon - Mann - Whitney Test. The nuclei of the studied tissues showed reduced values after cariometry for: greater, smaller, and mean diameter; perimeter, area, volume and volume/area relation. Stereologically, it was observed, in the junctional epithelium, adamantine epithelium, and in the inserted gum epithelium, cells with less volume, which caused a greater number of cells per mm^3 of tissue. The periodontal ligament was also disorganized and with smaller fibers. It was possible to conclude that zinc caused alterations in the adamantine epithelium, junctional epithelium, inserted gum and periodontal ligament, after morphometric and stereological evaluations.

Keywords: zinc, periodontium, lactation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Absorção do metal	16
2.2 Zinco e a lactação	18
2.3 Efeitos do zinco	22
3. PROPOSIÇÃO	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Animais e tratamento	36
4.2 Técnica de dissecação e técnica histológica	36
4.3 Morfometria (Cariometria)	37
4.4 Estereologia	37
4.5 Análise Estatística	43
5. RESULTADOS	44
5.1 Peso Corporal	45
5.2 Histopatologia	45
5.2.1 Epitélio Adamantino e Epitélio Juncional	45
5.2.2 Gengiva Inserida	47
5.2.3 Ligamento Periodontal	48
5.3 Morfometria (Cariometria)	48
5.3.1 Epitélio Adamantino	48
5.3.2 Epitélio Juncional	49
5.3.3 Gengiva Inserida	50
5.3.4 Ligamento Periodontal	51
5.4 Estereologia	55
5.4.1 Epitélio Adamantino	55
5.4.2 Epitélio Juncional	55
5.4.3 Gengiva Inserida	56
5.4.4 Ligamento Periodontal	57
6. DISCUSSÃO	61
7. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE	82

1. INTRODUÇÃO

O zinco (Zn) é um metal que integra o grupo dos metais pesados, mais especificamente o grupo IIB da tabela periódica de elementos químicos. Ele é um metal sólido de coloração branco azulada, que possui massa atômica de 65,39 u.m.a.; densidade de 7,14 g/cm³ e temperatura de fusão de 419,6°C (Cantero, 1989; Craig e Powers, 2004).

Os metais pesados são altamente reativos e bioacumuláveis. Os seres vivos necessitam de pequenas quantidades de alguns desses metais, incluindo o cobalto, cobre, manganês, molibdênio, vanádio, estrôncio e zinco, para a realização de funções vitais no organismo. O zinco está envolvido em uma variedade de processos celulares importantes para a adequada função de mais de 1000 proteínas, incluindo várias enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, tal como enzimas participantes da síntese de DNA e RNA (Vallee e Falchuk, 1993; Sandstead, 1994; Powell, 2000; Weiss et al., 2000; Tapiero e Tew, 2003; Xu et al., 2006; Maret e Krezel, 2007). Ele influencia a divisão celular, participa da manutenção estrutural da cromatina e das membranas biológicas (Canli e Furness, 1993; Szckurek et al., 2001; Tapiero e Tew, 2003).

Na odontologia, o zinco é utilizado na confecção de inúmeras ligas metálicas fundidas. Embora o uso de metais tenha diminuído nos últimos anos em virtude do aumento da procura por materiais estéticos, eles ainda são utilizados para a confecção de *copings* metálicos e subestruturas de restaurações metalocerâmicas, comumente empregados em prótese parcial fixa (Wataha e Messer, 2004; Anusavice, 2005). Estruturas metálicas de próteses parciais removíveis continuam sendo fundidas com o uso de metais e o zinco também pode estar presente em implantes e próteses implanto - suportadas (Xu et al., 2006; Shimpo, 2007).

As ligas metálicas são confeccionadas a partir da união de dois ou mais metais. Os elementos metálicos que compõem as ligas odontológicas podem ser divididos em dois grupos principais, o grupo dos metais nobres (ouro, paládio, platina, prata, ósmio, ródio, rutênio) e o grupo dos metais básicos (alumínio, berílio, cádmio, cobalto, cobre, chumbo, cromo, estanho, ferro, gálio, índio, manganês, mercúrio, molibdênio, níquel, silício, zinco, entre outros). Vários metais básicos são combinados com metais nobres para desenvolverem ligas com propriedades adequadas para as reabilitações orais. O zinco está presente em quantidades de aproximadamente 1 a 6 % (em peso) nas ligas de metais nobres. Alguns exemplos, como as ligas de Au-Cu-Ag-Pd (ouro-cobre-prata-paládio) podem conter de 1 a 2% de zinco; ligas de Au-Cu-Pd-In (ouro-cobre-paládio-índio) de 3,8 a 5,8% de zinco e ligas de Ag-Pd (prata-paládio) de 2,0 a 3,3% de zinco. Dentre as ligas de metais básicos pode ser citada a liga de Cu-Zn (cobre-zinco) que possui 45% de conteúdo de zinco (Craig e Powers, 2004).

Segundo Rincić et al. (2003) e Celebić et al. (2006), o conhecimento dos diversos metais integrantes das ligas odontológicas é de fundamental importância para assegurar a saúde dos pacientes. Todos os materiais precisam preencher requisitos rigorosos de segurança e eficácia. As ligas metálicas provocam preocupação pelo fato de poderem permanecer por muito tempo em contato com os tecidos bucais, quando presentes em extensas reabilitações orais.

As ligas metálicas entram em contato direto com os tecidos bucais e o ideal é que sejam biologicamente tolerantes, bioquimicamente indiferentes (manterem-se inalteradas) e eletricamente inertes (Schmalz e Garhammer 2002; Rincić et al., 2003). Uma liga metálica não pode ser tóxica ao paciente e ao profissional, deve apresentar boas propriedades mecânicas bem como adequadas propriedades físicas e químicas (Wataha, 2000).

A biocompatibilidade é definida como a capacidade de um material de ter uma resposta biológica apropriada numa aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com tecidos vivos ou fluidos orgânicos. Há a interação entre o corpo e o material. A colocação de um material no corpo cria uma interface que normalmente não está presente. Esta interface não é estática, é local de interações dinâmicas entre o material e o corpo. A utilização odontológica de alguns materiais desperta certas preocupações referentes à biocompatibilidade, uma vez que os mesmos estão desempenhando funções mais abrangentes no corpo e por períodos mais prolongados. As considerações sobre biocompatibilidade são importantes para os fabricantes, cirurgiões-dentistas, cientistas e pacientes (Wataha, 2000; Hanks et al., 1996; Schmalz, 1996,1997).

A biocompatibilidade das ligas metálicas está relacionada primariamente à liberação de seus elementos constituintes, fenômeno este denominado de corrosão. (Manaranche e Hornberger, 2005). O ambiente úmido da cavidade bucal é um meio propício para a ocorrência da corrosão, pois cria condições eletroquímicas favoráveis para tal (Lassila e Vallittu, 1998; Celebić et al., 2006; House et al., 2008). A corrosão metálica está associada à exposição do metal a um meio no qual exista a presença de moléculas de água, juntamente com o gás oxigênio ou íons de hidrogênio, ou seja, a um meio condutor. A interação das ligas com os fluidos bucais leva à ionização e consequente dissolução de seus íons metálicos constituintes (Lassila e Vallittu, 1998; House et al., 2008). Os átomos de zinco perdem seus elétrons para se tornarem íons positivos em solução (House et al., 2008).

A acidez do ambiente bucal, causada pelos ácidos provenientes da desintegração dos alimentos, do biofilme dental e do metabolismo microbológico; as oscilações de temperatura que ali ocorrem, bem como a abrasão mecânica das estruturas metálicas causada pelos

alimentos e mastigação, são fatores predisponentes para o processo de corrosão (Suzuki, 1995; Wataha e Lockwood, 1998; Schmalz e Garhammer 2002; Faccioni et al., 2003; Rincić et al., 2003; Celebić et al., 2006). Pastas dentais e bochechos podem favorecer uma condição bucal ácida contribuindo também para o processo de corrosão (House et al., 2008). Assim sendo, a corrosão depende muito do ambiente biológico com o qual o metal faz contato (Anusavice, 2005; House et al., 2008).

O fenômeno de corrosão é considerado extremamente complexo sendo dependente de uma variedade de fatores. Talvez o mais importante do ponto de vista da biocompatibilidade seja identificar e quantificar os elementos que são liberados das ligas. A resposta biológica depende do elemento liberado, da quantidade liberada e da duração de sua exposição aos tecidos (Wataha, 2000; Schmalz e Garhammer 2002). Elementos como prata, cobre, níquel, gálio e zinco tem uma maior tendência a serem liberados quando comparados à elementos como ouro e paládio (Wataha, 2000).

Os metais liberados podem penetrar nos tecidos bucais, atingir o trato gastrointestinal via saliva para ser absorvido pelo intestino, além de poder atingir todo o corpo através de seu transporte pela linfa e sangue (Bonda et al., 2001; Ferreira et al., 2003; Rincić et al., 2003; House et al., 2008). Os íons metálicos liberados na cavidade bucal podem levar à reações tóxicas locais, ou, mesmo, serem transferidos para órgãos distantes causando algum tipo de toxicidade sistêmica (Rincić et al., 2003). Artigos publicados relatam diminuição da vitalidade celular em culturas de células de tecidos gengivais, como fibroblastos e macrófagos, expostos à íons metálicos (Schmalz et al., 1998; Craig e Powers, 2004; Manaranche e Hornberger, 2005).

Estudo realizado por Nelson e colaboradores (1999), constatou que a perda de massa de ligas metálicas em soluções salinas após um período de 10 meses foi de $56,6 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ para a liga de Au-Ag-Cu (ouro-prata-cobre) e $1,4 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ para a liga de Au-Pd (ouro-paládio), comprovando o processo de corrosão das ligas fundidas em meio aquoso.

É importante ressaltar que exposições prolongadas à baixas doses podem causar respostas biológicas adversas. A liberação de zinco a curto prazo (1 a 2 dias) poderá não ter significância biológica, mas a longo prazo (mais de 2 a 3 anos) poderá trazer reações adversas locais e/ou sistêmicas (Craig e Powers, 2004).

Idealmente nenhum elemento da composição deveria ser liberado e agir sobre o organismo (Wataha, 2000; Manaranche e Hornberger, 2005). Existe um número de possíveis reações adversas biológicas tais como reações tóxicas, inflamatórias, alérgicas e mutagênicas (Anusavice, 2005). A realização de testes biológicos é de extrema importância para garantir a

segurança do contato dos metais com os tecidos do corpo (Stanford, 1986; Schmalz e Garhammer 2002). Os estudos sobre a interação de metais com doenças bucais provocam grande interesse dos pesquisadores e clínicos (Bonda et al., 2001).

Vale ressaltar que os técnicos de laboratório estão em contato íntimo e frequente com os metais e suas respectivas ligas, durante os processos de obtenção da liga, de confecção e de acabamento das estruturas para as reabilitações orais. Eles podem ser expostos ocasionalmente ou rotineiramente à concentrações excessivas de metais. Partículas metálicas podem ser encontradas no ar destes ambientes e atingirem o organismo via inspiração. Há possibilidade da inalação de vapores causar problemas no pulmão, além de outros efeitos sistêmicos (Hensten-Pettersen, 1992; Gilmour et al., 2006; Wallenborn et al., 2008).

A análise de efeitos biológicos adversos de metais depende muito da metodologia utilizada (Manaranche e Hornberger, 2005). Os testes podem ser realizados *in vivo* ou *in vitro*, através de culturas de osteoblastos, macrófagos, fibroblastos e outros tipos celulares (Hanks et al., 1996; Schmalz, 1996, 1997; Wataha, 2000; Catelas et al., 2003, 2005; Manaranche e Hornberger, 2005; Petit et al., 2005, 2006). Os testes em animais geralmente são realizados em mamíferos (camundongos, ratos, hamsters). O uso de um animal permite que ocorram interações complexas entre o material e o sistema biológico em função. As respostas biológicas nos testes em animais são mais abrangentes. As principais desvantagens destes testes são que eles podem ser de difícil interpretação e controle, e em alguns casos, muito onerosos. (Tennant et al., 1987; Craig e Powers, 2004). As técnicas histológicas constituem ferramentas úteis para avaliar os efeitos dos metais nos tecidos animais (Schmalz et al., 2000; Ferreira et al., 2003; Anusavice, 2005).

Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi o de avaliar os efeitos do zinco no epitélio juncional, epitélio adamantino, gengiva inserida e ligamento periodontal do rato, durante o período de lactação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Absorção do metal

Durante a prenhez e lactação ocorre um aumento na demanda de minerais essenciais para suprir as necessidades da mãe e dos filhotes, sendo, portanto, o período no qual as ratas estão mais suscetíveis à intoxicação pelo metal. O aumento da absorção de zinco neste período está associado ao aumento no tamanho e superfície do trato gastrointestinal (Campbell e Fell, 1964; Boyne et al., 1966). Além disto, o consumo de água pelas ratas é aumentado de 3 a 5 vezes durante a lactação, desta forma, associado ao aumento da absorção gastrointestinal, há um aumento no acúmulo de metal no corpo (Bhattacharyya et al., 1982, 1986). O consumo diário de água por ratas grávidas pode atingir valores de 110 a 140 mL/Kg de peso corporal (Szakmáry, 2001).

Segundo Bose et al. (1994) a absorção gastrointestinal de zinco após a sua administração oral é alta, sendo o metal distribuído para o fígado e rim. Fung et al. (1997) relatam que a absorção intestinal de zinco é o principal sítio regulatório para a homeostase do metal em humanos e animais. Estudo realizado por tais autores teve como objetivo determinar se a fração de absorção de zinco é alterada durante a gravidez e a lactação. As taxas de absorção de zinco no intestino das ratas mostraram um aumento de 80% em ratas grávidas e um aumento de 133% em ratas no período lactacional quando comparadas às ratas controles.

Metais que entram no corpo podem ser amplamente distribuídos pelo sangue e linfa. A estrutura química do metal influencia em sua absorção, distribuição, retenção e excreção. O organismo geralmente elimina metais pela urina e fezes (Wataha, 2000).

O zinco é absorvido ao longo do intestino delgado, principalmente no jejuno e no íleo, e quantidades diminutas são absorvidas no estômago e intestino grosso (Valle e Falchuk, 1993). A absorção ocorre por transporte ativo e passivo, sendo absorvido de 20 a 30% do zinco ingerido. Na gravidez há aumento da absorção de zinco, a cada 1mg por dia de metal absorvido, 0,7 mg é transferido para o feto (King, 2000).

Após ser absorvido, o zinco é liberado pela célula intestinal, passa para os capilares mesentéricos e é transportado pelo sangue portal, sendo captado pelo fígado e distribuído para outros tecidos. Há genes que codificam proteínas presentes na membrana celular, sendo as mesmas responsáveis pelo transporte de zinco, permitindo o fluxo deste mineral a órgãos como intestino, rins, fígado, ossos, testículos, cerebelo e glândulas mamárias (Cousins e McMahon, 2000).

A metalotioneína citoplasmática, principal enzima envolvida no metabolismo do zinco, pode ligar-se a, até, sete átomos de zinco. Sua principal função está na regulação do metabolismo corporal total do metal (Salgueiro et al., 2000).

O estudo realizado por Tandon e colaboradores (2001), avaliou a distribuição subcelular hepática e renal de zinco após 24, 48 e 72 horas da administração de dose de 15 μmol de cloreto de zinco / Kg de peso corporal em ratos albinos machos. Após 24 horas ocorreu um aumento de 16 a 17% nas concentrações totais de zinco no fígado e no rim. Ao atingir 72 horas, a concentração de zinco no fígado aumentou 43% enquanto no rim a concentração diminuiu 8%. A concentração média de zinco após o período de 24 horas foi de 8,4 $\mu\text{g/g}$ no fígado e de 10,9 $\mu\text{g/g}$ no rim; após o período de 48 horas a concentração foi de 10,1 $\mu\text{g/g}$ no fígado e de 12,8 $\mu\text{g/g}$ no rim, por fim, após o período de 72 horas, as concentrações foram de 14,8 $\mu\text{g/g}$ no fígado e de 12,4 $\mu\text{g/g}$ no rim. Os autores concluíram que o zinco possui retenção prolongada em fígado e rins de mamíferos.

Nos mecanismos envolvidos na absorção intestinal de zinco estão presentes pelo menos quatro proteínas. O zinco absorvido pelo organismo pode ser encontrado em todos os órgãos, sendo 85 % em músculos e ossos, 11% na pele e no fígado e o restante distribuído para todos os outros tecidos. Intracelularmente, o zinco se distribui entre 30% e 40% no núcleo, 50% no citoplasma e organelas e o restante na membrana celular (Tapiero e Tew, 2003).

Segundo Hambidge et al. (2006), quantificar o zinco absorvido de uma dieta habitual fornece informações úteis quanto à capacidade do organismo de absorver o metal em outras condições fisiológicas bem como patológicas. Os autores relataram que o final da gestação é um exemplo de circunstância fisiológica em que há ausência de dados quanto à absorção de zinco. Eles realizaram um estudo com 17 mulheres da região sul da Etiópia (população rural pobre) no terceiro trimestre de gravidez, para estimar a quantidade de metal absorvido em um dia. Para tal, foi feita a administração oral de isótopos estáveis de zinco em cada uma das três refeições consumidas durante o dia. Depois do almoço, o zinco foi também administrado por via intravenosa. Amostras de urina foram coletadas diariamente, começando no terceiro dia após a administração dos isótopos. Foi administrado entre 1300 e 1400 μg de zinco oralmente por dia e 500 μg intravenosamente. A média de zinco absorvida foi de $6,0 \pm 3,2$ $\mu\text{g/dia}$ e a média de zinco encontrada no plasma foi de $44,1 \pm 6,0$ $\mu\text{g/dL}$. A fração de zinco absorvida foi calculada baseada nas concentrações de zinco na urina. Os autores discutem que a quantidade de zinco absorvida por esta população foi baixa quando comparada aos valores estimados para o terceiro trimestre de gravidez.

2.2 Zinco e a lactação

Cloreto de zinco (2 mg / Kg) foi injetado em ratas grávidas no dia do parto. Esta injeção resultou em excreção do metal no leite materno. O estudo avaliou que a concentração de zinco no leite foi alta durante os dois primeiros dias de lactação, ocorrendo um declínio nos dias subsequentes. Após o período de lactação, os filhotes foram sacrificados. A distribuição de zinco nos organismos dos filhotes proveniente do leite materno foi rápida e revelou a presença do metal em todos os tecidos dos mesmos. As maiores concentrações foram encontradas no intestino, seguidas do fígado, rim e coração. Os autores concluíram que em ratas lactantes, ampla quantidade de zinco apareceu no leite materno comprovando que o metal injetado foi transferido para o mesmo, com conseqüente absorção pelos tecidos dos respectivos filhotes (Lucis et al., 1972).

Um estudo realizado por Casey et al.(1985) avaliou as concentrações de zinco, cobre, manganês e cromo de um total de 259 amostras de leite humano de 11 mulheres desde o dia do parto até o 31º dia pós-parto (período de lactação). A média de ingestão diária de zinco foi de 2 mg. O zinco foi analisado através de espectrofotometria de absorção atômica. As concentrações de zinco nas amostras de leite foram de $7,94 \pm 5,65 \mu\text{g/mL}$ no 1º dia pós-parto; $11,5 \pm 4,7 \mu\text{g/mL}$ no 2º dia; $9,34 \pm 1,97 \mu\text{g/mL}$ no 3º dia; $6,40 \pm 0,66 \mu\text{g/mL}$ no 4º dia; $5,42 \pm 1,11 \mu\text{g/mL}$ no 5º dia; $4,74 \pm 1,02 \mu\text{g/mL}$ no 8º dia; $3,88 \pm 0,91 \mu\text{g/mL}$ no 14º dia; $3,71 \pm 1,09 \mu\text{g/mL}$ no 21º dia e $2,98 \pm 0,78 \mu\text{g/mL}$ no 28º dia. As concentrações de zinco foram maiores nos três primeiros dias pós-parto e a relativa instabilidade destas concentrações durante a primeira semana pós-parto reflete as mudanças fisiológicas da glândula mamária. O maior declínio encontrado foi o de uma lactante no quinto dia de lactação, cuja concentração de zinco apresentou uma queda de 73% e o menor declínio foi o de 29% na concentração total do metal. Os autores discutem o fato de que as concentrações do metal dependem muito do momento em que a amostra de leite é colhida, sendo este um fator de importante influência sobre os resultados obtidos. O estudo comprovou que parte do zinco ingerido é transferido para o leite materno.

O leite é uma fonte natural de nutrientes para o recém-nascido. O colostro deve suprir todas as demandas metabólicas do recém-nascido durante os três primeiros meses de vida, proporcionando os carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais necessários para o crescimento dos tecidos, bem como para a maturação e funcionamento de vários sistemas enzimáticos do filhote (Biego et al., 1998; Rossipal et al., 2000; Wappelhorst et al, 2002).

Fung et al. (1997), realizaram um estudo no qual treze mulheres participantes receberam um suplemento diário de 6,6 mg de zinco na refeição matinal. Foram coletadas amostras de urina e sangue nos seguintes períodos: 8^a a 10^a semana de gestação; 24^a a 26^a semana de gestação, 34^a a 36^a semana de gestação e 7^a a 9^a semana de lactação (pós - parto). A média de zinco ingerido (dieta + suplemento) ao longo do estudo foi de $15,1 \pm 0,1$ mg/dia. A ingestão de zinco aumentou 23 % do início da gestação para o terceiro trimestre (aumento de 2,3 mg/dia). A quantidade de zinco no leite materno teve média de absorção de 2,0 mg/dia. A ingestão de zinco foi de $10,0 \pm 0,7$ mg/dia da 8^a - 10^a semana de gestação; $11,3 \pm 0,6$ mg/dia da 24^a - 26^a semana de gestação; $12,3 \pm 0,9$ mg/dia da 34^a - 36^a semana de gestação e $11,2 \pm 0,7$ da 7^a - 9^a semana de lactação. A fração de zinco absorvida teve aumento de 25% durante a lactação, chegando a um aumento de até 75% durante este período.

Segundo Rossipal e Krachler (1998), o recém-nascido consome diariamente entre 150 e 180 mL de leite por quilograma de peso corporal, satisfazendo as suas necessidades calóricas. As deficiências em minerais durante este período podem interferir no desenvolvimento dos filhotes. Em contraste, a presença desses elementos metálicos em altas concentrações ou a presença de micro-poluentes metálicos e tóxicos, inclusive em baixas concentrações, podem causar alterações celulares e acarretar manifestações clínicas nos recém-nascidos. Os efeitos do metal dependem do nível e da duração de sua exposição ao organismo (Biego et al., 1998).

Rossipal e Krachler (1998) realizaram um estudo no qual amostras de leite foram coletadas de 46 lactantes, do 1^o ao 293^o dia pós-parto, para determinar as concentrações de elementos minerais, entre eles o zinco, e avaliar as mudanças nas concentrações destes elementos durante a lactação. As amostras e os períodos avaliados foram: 13 amostras de colostro (C) - 1^o ao 3^o dia de lactação; 18 amostras de leite maturado (M1) - 42^o ao 60^o dia de lactação; 24 amostras de leite maturado (M2) - 97^o ao 293^o dia de lactação. As médias das concentrações de zinco encontradas nestas amostras de leite foram respectivamente de 4,7 µg/L (C), 560 µg/L (M1) e 380 µg/L (M2). Os resultados do estudo demonstraram um aumento nas concentrações de zinco do colostro para o leite maturado M1. Um aumento da absorção intestinal pode ser a razão para o acréscimo da biodisponibilidade do elemento mineral para a glândula mamária com consequente incremento em sua concentração no leite.

Estudo realizado por Rossipal et al. (2000) avaliou a transferência de elementos metálicos da mãe para o filho no final da gestação e início da lactação. Para tal, foram colhidas amostras de leite e sangue maternos. A concentração média de zinco no sangue placentário foi de 610 µg/L e a sua concentração no colostro foi de 8970 µg/L. Há um

mecanismo de transporte intenso e ativo de zinco e outros elementos metálicos pelo epitélio da glândula mamária, embora esta glândula represente uma barreira entre o sangue materno e o leite materno. Os resultados do estudo comprovaram uma transferência muito ativa de zinco entre a mãe e o recém-nascido através do leite materno, sendo esta maior do que a que foi transferida pela placenta.

A ingestão diária de elementos minerais (através de alimentos e bebidas) pelas mães influencia na concentração destes elementos no leite materno (Rossipal e Krachler, 1998). O consumo de alimentos por ratas grávidas atinge valores de 1010 a 1200 J/Kg de peso corporal (Szakmáry, 2001).

Durante a lactação, uma quantidade substancial de zinco é transportada através da glândula mamária para o leite, quase o dobro do que é transferido diariamente através da placenta para o feto (Kelleher e Lönnerdal, 2003). Kelleher e Lönnerdal (2003) ao realizarem um estudo com ratas lactantes constataram que ao longo do período lactacional de 20 dias, as concentrações de zinco no plasma e na glândula mamária aumentaram, enquanto que a concentração de zinco no leite materno gradualmente diminuiu. Isto foi um indicativo de que a glândula mamária regula rigorosamente a quantidade de metal secretado no leite. No quinto dia de lactação, a concentração média de zinco na glândula mamária foi de $0,17 \mu\text{mol/L} \pm 0,02$ e no leite de $0,14 \mu\text{mol/L} \pm 0,03$, no vigésimo dia de lactação este valor foi de $0,20 \mu\text{mol/L} \pm 0,02$ para a glândula mamária e de $0,11 \mu\text{mol/L} \pm 0,01$ para o leite.

Estudo realizado por Donangelo et al. (2005) avaliou a fração de zinco absorvida e a cinética do zinco em 10 mulheres saudáveis com ingestão diária de 9 mg do elemento. A concentração de zinco foi avaliada no período da 10^a a 12^a semana de gestação, 34^a a 36^a semana de gestação e 7^a a 8^a semana pós-parto (período de lactação). A média de ingestão de zinco foi de $9 \pm 3 \text{ mg/dia}$ durante todo o experimento. A fração de absorção de zinco foi 49% mais alta no final da gestação e início da lactação do que no início da gestação. Estes dados comprovaram um aumento da absorção de zinco ao longo da gestação e início da lactação. As concentrações de zinco na urina não apresentaram diferenças significantes ao longo do estudo ($8.4 \pm 3.1 \mu\text{mol/dia}$ - início da gestação; $9.5 \pm 3.5 \mu\text{mol/dia}$ - fim da gestação e $8.6 \pm 4.3 \mu\text{mol/dia}$ - início da lactação). Os autores relatam que a absorção de zinco é eficiente durante a gestação e lactação. Não foram encontradas diferenças significantes entre as concentrações de metalotioneínas nos eritrócitos dos diferentes períodos experimentais ($2.9 \pm 0.6 \text{ nmol/g}$ proteína; $2.9 \pm 0.5 \text{ nmol/g}$ proteína; $3.2 \pm 0.6 \text{ nmol/g}$ proteína, respectivamente). A concentração de zinco no eritrócito foi de $0.50 \pm 0.07 \mu\text{mol/g}$ para o início da gestação, esta

concentração sofreu um pequeno aumento indo para $0.54 \pm 0.05 \mu\text{mol/g}$ no final da gestação e $0.57 \pm 0.11 \mu\text{mol/g}$ no início da lactação.

Segundo Khosravi et al. (2006), o leite é considerado o alimento ideal para os lactentes quando comparado a todos os outros tipos de alimentos. É de grande importância obter dados exatos sobre a composição do mesmo. Os autores avaliaram as concentrações de zinco no plasma e no leite materno durante 5 meses de lactação após a ingestão de suplementos do elemento. Cento e trinta e oito mulheres lactantes saudáveis participaram do estudo tendo início uma semana pós-parto. As participantes do grupo de estudo ($n=67$) receberam um suplemento semanal de zinco (100 mg) que foi administrado através de duas cápsulas (50 mg do elemento em cada cápsula) e as demais participantes formaram o grupo placebo ($n=71$). As concentrações de zinco no plasma e leite materno foram determinadas através de espectrofotômetro de absorção atômica. As médias das concentrações de zinco no plasma na primeira semana e no quinto mês de lactação para o grupo tratado (ZG) foram de $124,9 \pm 52,8 \mu\text{g/dL}$ e de $121 \pm 27,1 \mu\text{g/dL}$, respectivamente. Para o grupo placebo (PG) estes valores foram de $134 \pm 49,1 \mu\text{g/dL}$ e de $115,6 \pm 23 \mu\text{g/dL}$, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos. A concentração de zinco no leite para ZG foi de $310 \pm 138 \mu\text{g/dL}$ na primeira semana de lactação e de $118 \pm 64 \mu\text{g/dL}$ no quinto mês de lactação (declínio de 52%). Os valores correspondentes para PG foram de $322 \pm 161 \mu\text{g/dL}$ e de $109 \pm 70 \mu\text{g/dL}$ respectivamente (declínio de 60%). Diferenças significantes entre os dois grupos foram encontradas nas concentrações de zinco no leite no terceiro e no quarto mês de lactação, sendo que no terceiro mês o valor encontrado foi de $159 \pm 73 \mu\text{g/dL}$ para o grupo tratado e de $129 \pm 57 \mu\text{g/dL}$ para o grupo placebo. No quarto mês estes valores foram de $111 \pm 54 \mu\text{g/dL}$ (ZG) e de $103 \pm 66 \mu\text{g/dL}$ (PG), respectivamente. Os autores sustentam que o declínio no nível de zinco plasmático durante a lactação pode ter ocorrido devido à fatores inerentes da suplementação, como a forma da ingestão do zinco, tipo de administração do suplemento (diária ou semanal), a dose de administração do elemento bem como a técnica para detectar sua presença.

O'Brien et al. (2007) avaliaram as concentrações de prolactina no plasma, as concentrações de zinco no plasma bem como no leite de mulheres lactantes. A prolactina é um hormônio importante para o início e a manutenção da lactogênese e se liga ao zinco. Dezesesseis de 26 mulheres receberam uma dose de 15 mg/dia de suplemento de zinco durante sete meses pós-parto, resultando em um aumento significativo no consumo total do mineral em comparação às participantes não suplementadas (grupo controle). Amostras de sangue e de leite foram coletadas logo após o parto, três e sete meses pós-parto. A média de ingestão

diária de zinco foi de $12 \pm 3,6$ mg. Quando o suplemento foi considerado, esta média de ingestão diária de zinco foi de $26,1 \pm 1,0$ mg. As concentrações de zinco no plasma para o grupo tratado foram de $78,7 \pm 8,4$ $\mu\text{g/dL}$ (logo após parto), $91 \pm 11,0$ $\mu\text{g/dL}$ (três meses pós-parto) e de $86,9 \pm 11,2$ $\mu\text{g/dL}$ (sete meses pós-parto). Estes valores para o grupo controle foram de, $83,4 \pm 7,1$ $\mu\text{g/dL}$; $82,0 \pm 11,1$ $\mu\text{g/dL}$ e $86,3 \pm 9,2$ $\mu\text{g/dL}$, respectivamente. As concentrações de zinco no leite para o grupo tratado foram de $3,7 \pm 1,0$ $\mu\text{g/mL}$ (logo após parto), $1,5 \pm 0,8$ $\mu\text{g/mL}$ (período de três meses), e de $0,8 \pm 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ (após sete meses). As concentrações de prolactina no plasma foram de 132 ± 70 $\mu\text{g/dL}$ (logo após parto), 68 ± 50 $\mu\text{g/dL}$ (após três meses) e de 36 ± 28 $\mu\text{g/dL}$ (após sete meses). Para o grupo controle estes valores foram de: 142 ± 89 $\mu\text{g/dL}$; 70 ± 62 $\mu\text{g/dL}$; 46 ± 46 $\mu\text{g/dL}$, respectivamente. O estudo ressalva que elementos minerais como o zinco, após administração oral, são encontrados no plasma bem como no leite materno.

2.3 Efeitos do zinco

Parr e Taylor (1964) relatam que é de extrema importância que os pesquisadores determinem as concentrações de íons metálicos nos tecidos humanos e de animais e como essas concentrações podem se tornar prejudiciais e causadoras de efeitos biológicos adversos.

Yoshida et al. (1986) demonstraram que a administração subcutânea de 125 $\mu\text{mol/Kg}$ de cloreto de zinco (ZnCl_2) em ratos Wistar machos e fêmeas induziu a atividade enzimática da heme oxigenase hepática com concomitante declínio do citocromo P-450. A heme oxigenase hepática é responsável pelo consumo do anel heme integrante da estrutura molecular das enzimas que constituem o citocromo P-450. Além disso, foi também constatado um aumento na atividade das enzimas ornitina descarboxilase (ODC) hepática e renal. Sabendo-se que a ornitina descarboxilase é uma enzima que está envolvida no controle do crescimento celular e na resposta à estímulo tóxico e hormonal, os autores levantaram, então, a hipótese de que a ação do zinco sobre esta enzima poderia estar relacionada aos efeitos citotóxicos do metal no fígado e rim.

Hildebrand et al. (1989) (apud Hensten-Pettersen, 1992), avaliando 139 casos publicados de reações adversas ocorridas em usuários de próteses parciais removíveis, constataram sintomas locais como gengivite e estomatite em 99 pacientes, reações de pele

eczematosas (33 pacientes). Pacientes com suspeita de alergia ao metal podem apresentar lesões tanto sistêmicas como locais, na mucosa ou na derme.

Cátions metálicos bivalentes podem alterar a estrutura do DNA o que faz dos íons, potentes moduladores da função do DNA. Metais com forte afinidade por base perturbam a ligação de hidrogênio entre pares de bases. Os cátions metálicos ligam-se preferencialmente às regiões GC do que regiões AT. O sítio N7 da guanina é reconhecido como um importante sítio de interação do metal (Duguid et al., 1993; Gao et al., 1993). A condensação do DNA é importante para a sua função de transmitir e proteger a informação genética. Segundo Deng e Bloomfield (1999), *in vitro*, a condensação pode ser induzida pela adição de agentes condensadores em soluções aquosas de DNA. As interações específicas dependem da estrutura do agente condensador. Alguns cátions multivalentes podem precipitar o DNA em altas concentrações.

Schedle et al. (1995) avaliaram os efeitos citopatogênicos de 13 cátions metálicos em fibroblastos humanos gengivais. Os resultados do estudo comprovaram que a citotoxicidade do metal foi dose-dependente e que a estrutura da célula foi alterada após exposição aos metais, revelando sinais de necrose. Foi demonstrado também que o cátion metálico induz à perda de função celular, e que tais efeitos possam estar relacionados à alterações na estrutura do DNA.

Pacientes com suspeita de alergia ao metal podem apresentar lesões tanto sistêmicas como locais, na mucosa ou na derme. De 275 pacientes avaliados, 37 apresentaram reações alérgicas ao zinco, sendo 12 homens e 25 mulheres. O zinco foi o décimo elemento com maior número de reações positivas (Suzuki, 1995).

A IL-6 assim como a IL-1 são citocinas envolvidas na indução e regulação do processo inflamatório. Essas citocinas são comumente produzidas por macrófagos e células T; fibroblastos e queratinócitos podem também produzir IL-1 e IL-6. As citocinas desencadeiam respostas imunológicas como a diferenciação de linfócitos B, secreção de anticorpos e proliferação de linfócitos T. A IL-1 causa proliferação de fibroblastos, reabsorção óssea bem como produção de prostaglandina E₂ por fibroblastos e condrócitos. As interleucinas são importantes na inflamação gengival e periodontal (Masada et al., 1990; Akira, 1992; Feliciani et al., 1996). Kamagata et al. (1989) (apud Schmalz et al., 1998), encontraram em biópsias de tecidos gengivais inflamados altas concentrações de IL-6 e IL-1 quando comparadas às dos tecidos saudáveis. Takahashi e colaboradores (1994) detectaram a presença de IL-6 em fibroblastos, células endoteliais e macrófagos de tecidos gengivais inflamados. Lipopolissacárides de patógenos bucais são capazes de promover inflamação dos tecidos

periodontais através da estimulação de fibroblastos gengivais e células do ligamento periodontal a secretarem IL-6.

Em estudo realizado com culturas de fibroblastos humanos e células epiteliais, o zinco aumentou significativamente a síntese de prostaglandina E_2 (PGE_2), um mediador proinflamatório. A PGE_2 liberada leva à vasodilatação, aumenta a permeabilidade vascular e altera a função da célula imunológica (Schmalz et al., 1997).

Schmalz et al. (1998) realizaram um estudo *in vitro* avaliando a viabilidade celular e a síntese de IL-6 através da exposição de culturas de fibroblastos humanos à espécimes confeccionados à partir de metais como paládio, cobre, níquel, zinco, índio e cobalto. A viabilidade celular foi determinada pelo método MTT (atividade da desidrogenase mitocondrial). Após 24 horas de exposição ao zinco, a viabilidade celular foi reduzida em 63% quando comparada ao grupo de células controle que não foi exposto ao metal. Os resultados também demonstraram um aumento de 16 vezes na produção de IL-6 pelas células expostas ao zinco. Segundo os achados deste estudo, sugere-se que os íons metálicos estão envolvidos em atividade pró-inflamatória. A IL-6 e a PGE_2 são dois possíveis mediadores de inflamação gengival e periodontal.

Schmalz e colaboradores (2002) reafirmam a importância de estudos que avaliam a influência dos metais sobre a síntese de substâncias celulares envolvidas em reações inflamatórias. Mudanças nos níveis destas moléculas podem indicar respostas teciduais servindo como indicadores de efeitos biológicos adversos dos materiais dentários (Schmalz et al., 2000).

Há grande interesse por parte dos epidemiologistas em avaliar se há algum tipo de ligação entre a exposição à metais no momento de formação do dente e o aumento da incidência de cáries (Watson et al., 1997). Gerlach e colaboradores (2000) investigaram o efeito do zinco na atividade de proteinases da matriz de esmalte usando os métodos de ensaio colorimétrico, zimografia de gelatina e caseína e teste de degradação de proteína do esmalte *in vitro*. Os autores se basearam na hipótese de que muitas enzimas envolvidas no metabolismo dos componentes da matriz extracelular (enzimas proteolíticas) possam ter suas atividades inibidas por excesso de íons metálicos. Essas proteinases da matriz do esmalte possuem papel central na maturação deste tecido dental (elas degradam a matriz orgânica para a deposição dos cristais do esmalte), assim, a inibição dessas enzimas poderá resultar em uma amelogenese imperfeita. O estudo foi realizado em incisivos de ratos Wistar, e extrato de esmalte com suas proteases foi testado *in vitro*, utilizando-se para tal solução de sal de zinco

(concentrações de 110 μmol a 3mmol). Os resultados demonstraram que o zinco inibiu a proteólise interferindo no processo normal de amelogênese.

Segundo Kocadereli et al. (2000), os metais são liberados dos braquetes e arcos ortodônticos durante os primeiros 4 ou 5 meses de terapia ortodôntica sendo absorvidos pelos pacientes com distribuição sistêmica. Os autores relatam que mesmo concentrações não elevadas do metal podem ser suficientes para induzir efeitos biológicos adversos importantes nas células da mucosa bucal.

Íons de Zn^{+2} podem ser potencialmente tóxicos aos neurônios em cultura e parece provável que o movimento do íon (Zn^{+2}) dos neurônios pré-sinápticos aos pós-sinápticos contribua para a lesão do neurônio observada em condições de epilepsia, isquemia e trauma no cérebro. O Zn^{+2} está presente em concentrações particularmente elevadas em cérebro de mamíferos. Embora seja um co-fator para muitas enzimas em todos os tecidos, uma característica única do Zn^{+2} no cérebro é a sua localização vesicular em terminais pré-sinápticos, onde a sua liberação é dependente da atividade neuronal. Embora o significado fisiológico da liberação de Zn^{+2} sináptico seja pouco compreendido, provavelmente ele desempenhe um papel modulador na transmissão sináptica. A liberação excessiva de Zn^{+2} e seu acúmulo nos neurônios pós-sinápticos podem levar à perda neuronal que está associada a determinadas condições agudas, como a epilepsia e a isquemia global transitória. Os mecanismos através dos quais o zinco intracelular promove morte celular vem sendo avaliados. Há evidências de que o zinco entre nos neurônios através dos canais de cálcio. Acredita-se que a inibição metabólica e a geração de espécies reativas de oxigênio sejam fundamentais para a neurotoxicidade do zinco. As mitocôndrias são sítios importantes para a ação tóxica do metal. Uma possível explicação seja também a alteração nas concentrações de Ca^{+2} e nos canais de Cl^- e K^+ que o zinco pode acarretar. A elucidação das ações patológicas de Zn^{+2} no cérebro é importante para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para tais condições (Weiss et al., 2000).

Bonda et al. (2001) avaliaram biópsias de mucosa bucal de dois casos patológicos afetados por líquen plano. Os autores acreditam haver relação entre a presença de líquen plano na mucosa bucal, bem como de alergia e hipersensibilidade, e a exposição à metais, já que íons metálicos foram encontrados nas biópsias dos tecidos patológicos tendo sido liberados na cavidade bucal de suas respectivas ligas odontológicas. Este tipo de investigação é prejudicada por várias dificuldades experimentais, tais como problemas relacionados à coleta das amostras e à necessidade de se detectar e medir quantidades muito pequenas de metais nestas amostras biológicas.

Os metais acumulados em excesso são direcionados para uma proteína detoxificadora como a metalotioneína ou a ferritina (Rainbow, 1997). As metalotioneínas têm a capacidade de entrar no núcleo das células e ligar-se a íons de metais como o Zn^{+2} , Cu^{+3} , Cd^{+2} (Bremmer, 1991; Cherian et al., 1994; Iszard et al., 1995). A quantidade de metalotioneínas no fígado, rins e intestino pode ser aumentada pela ingestão oral ou injeção intravenosa de sais de cádmio, cobre ou zinco. Vários hormônios como glicocorticóides, glucagon, adrenalina e interleucina I também aumentam a produção de metalotioneínas. As funções dessas proteínas são as de armazenar metais tóxicos numa forma não tóxica, regular o metabolismo do zinco e do cobre celular, além de regular a absorção desses metais no intestino (Tandon et al., 2001). Células de mamíferos que perderam a capacidade de produzir tais proteínas são extremamente sensíveis aos danos causados por íons metálicos, enquanto que as células que as produzem em um nível acima do normal são mais resistentes aos danos causados por tais íons. A magnitude de síntese pode variar com a exposição ou administração do metal bem como com a extensão de seu acúmulo em algum órgão em particular (Tandon et al., 2001). Tandon e colaboradores (2001) avaliaram o nível de indução de metalotioneína no fígado após 24, 48 e 72 horas da administração de dose de 15 μmol de zinco/Kg de peso corporal em ratos albinos machos. Houve um aumento na concentração de metalotioneína no fígado, sendo que o maior valor foi encontrado após o período de 48 horas de sua administração.

Mockers et al. (2002) descrevem que os produtos de corrosão de aplicações ortodônticas podem causar efeitos biológicos adversos como glossite, sangramento, inflamação e hipertrofia gengival. Os autores também relatam que os níveis de íons liberados dos aparelhos ortodônticos podem não ser tóxicos na ingestão diária, mas, muitas vezes, são capazes de induzir danos ao DNA das células da mucosa bucal, com diminuição da capacidade de reparo destas células.

Messer e Lucas (2002) realizaram um estudo no qual foi determinado a localização celular e o acúmulo de íons intracelular usando espectroscopia de absorção atômica. Fibroblastos gengivais humanos foram expostos à metais por 72 horas. Os resultados do estudo demonstraram que os íons metálicos foram encontrados na membrana plasmática com a ocorrência de alterações nestas células do epitélio gengival.

Os íons de zinco (Zn^{+2}) formam complexos com proteínas e ácidos nucleicos, participam da transmissão e regulação da expressão da informação genética bem como participam da estruturação da cromatina e biomembranas (Tapiero e Tew, 2003). Kelleher e Lönnnerdal (2003) relatam que o zinco é requerido por muitas proteínas envolvidas na síntese do DNA, mitose e divisão celular. O zinco é um elemento que interage com muitas entidades

celulares, atuando na respiração celular, transporte de oxigênio, bem como na transcrição do DNA. Em concentrações excessivas, o metal pode ligar-se inapropriadamente a moléculas sensíveis formando perigosos radicais livres.

Alguns estudos demonstram que os íons metálicos penetram na membrana celular plasmática, ligam-se à enzimas celulares e modulam a expressão de citocinas sendo assim mediadores de respostas adversas locais e de respostas teciduais remotas (Catelas et al., 2003, 2005).

Estudo *in vitro*, realizado por Rincić e colaboradores (2003), avaliou o comportamento da liga de Co-Cr-Mo em soluções de diferentes composições e com diferentes valores de pH, ao longo de um período de 30 dias. As amostras da liga foram imersas, nestas três diferentes soluções: primeira solução - saliva (pH 6,0); segundo solução - tampão fosfato (pH 3,5) e terceira solução - mistura de ácido láctico, ácido fórmico e ácido acético (pH 3,5). As avaliações foram feitas no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de imersão. A análise dos resultados demonstrou que durante o período experimental, íons de cobalto (Co), cromo (Cr), ferro (Fe), zinco (Zn) e níquel (Ni) foram liberados da liga a partir das amostras testadas em todas as três soluções descritas. Zinco, ferro e cromo apareceram em maiores concentrações na solução com menor pH (pH - 2,5). A quantidade de zinco liberada nesta solução atingiu valor de 1000 microgramas por litro de solução após o período de 30 dias de imersão. Os autores constataram que a liberação dos íons foi dependente da solução bem como da duração de imersão da liga, além disso, o estudo comprovou que metais que estavam em menores concentrações na liga (como o zinco, o ferro e o níquel) foram detectados nas soluções.

Garhammer et al. (2004) realizaram um estudo avaliando a corrosão das ligas metálicas odontológicas, para tal foi examinado o conteúdo de metais na saliva de pacientes com e sem restaurações metálicas (respectivamente, grupos tratado e controle). A análise da saliva foi realizada usando espectroscopia de absorção atômica. Metais como prata, cobre, cromo, ferro, níquel e zinco foram encontrados na saliva de todos os pacientes (tratado e controle), mas os resultados apresentaram diferenças estatisticamente significantes para o conteúdo de metais nestes dois grupos. As concentrações de metais foram maiores para os pacientes que apresentavam restaurações metálicas do que os que não as possuíam. Foram atribuídos *scores* para os metais encontrados na saliva. Para o grupo controle (*scores* variando de 0 a 4) a média de conteúdo de zinco recebeu valor 3, para o grupo tratado este conteúdo recebeu valor 4. Os autores discutem que nas amostras de saliva de pacientes sem restaurações metálicas também foram encontrados os metais indicando que outros fatores

além das restaurações podem afetar o conteúdo destes. As composições e propriedades da saliva podem ser afetadas por muitas variáveis fisiológicas tais como nutrição, dieta e fluxo salivar. O conteúdo de metal pode variar conforme o momento em que a amostra de saliva é colhida. O estudo mostrou que em pacientes com restaurações metálicas, os componentes das ligas foram encontrados em maiores concentrações na saliva do que em pacientes que não apresentavam tais restaurações.

O objetivo do estudo realizado por Manaranche e Hornberger (2005) foi o de encontrar correlações entre a corrosão e a bicompatibilidade de metais. Diferentes categorias de ligas foram testadas sendo imersas em soluções altamente corrosivas (pH=2,3, ácido láctico 9 g/L) durante 7 dias. Os espécimes testados possuíam uma superfície estimada para uma coroa total de molar: 2,1 cm². Os íons liberados na solução foram analisados. Os corpos-de-prova foram também imersos em culturas de células (fibroblastos de ratos) por 48 horas e o material foi considerado citotóxico quando da presença de 25% ou mais de redução do número de células viáveis. A quantidade de zinco liberada pela superfície do corpo-de-prova foi de 0,53 mg/dia. Dos metais avaliados como gálio, cobre e índio, o zinco foi o segundo mais citotóxico com concentração de 4,8 ppm necessária para induzir 25% de morte celular. Os autores discutem que não foi encontrada uma correlação linear entre a quantidade de íon metálico liberado e o seu efeito na bicompatibilidade.

Takatsuka et al. (2005) avaliaram sítios de afinidade de átomos de zinco em dentina tratada com compostos do respectivo metal. Foi utilizada a técnica de espectroscopia de absorção de raios-X de fina estrutura. Os resultados demonstraram que os íons de zinco possuem dois possíveis sítios de afinidade na dentina que são os seus compostos orgânicos (colágeno, proteína) e inorgânicos (hidroxiapatita). A dentina é formada em sua maior porcentagem por componentes orgânicos, sendo o colágeno o seu principal constituinte, no entanto, a maior parte dos átomos de zinco foi detectada na hidroxiapatita e não no colágeno. Os átomos de zinco não atacaram a superfície dos cristais de hidroxiapatita, mas foram incorporados nos sítios de cálcio na unidade de hidroxiapatita. Os átomos de zinco substituem cálcio nos cristais de hidroxiapatita tratada com cloreto de zinco (ZnCl₂). Os íons cálcio competem com íons de zinco. Há dois tipos de sítios de cálcio na hidroxiapatita chamados de Ca(I) e Ca(II). Os autores relataram que não foi possível determinar neste estudo em qual sítio de cálcio os átomos de zinco estavam localizados. Estudo posterior realizado por Tang et al. (2009), demonstrou que os íons de zinco possuem maior afinidade pelo sítio Ca(II) da dentina, competindo com os íons de Ca⁺² neste sítio.

Celebić et al. (2006) avaliaram a liberação de vários íons, tais como, íons de Al, Ag, Au, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Mg, Mo, Ni, Pd, Pt, Ti e Zn de ligas de Au-Pt (ouro e platina). As amostras da liga foram imersas em três diferentes soluções: primeira solução - saliva (pH 6,0); segunda solução - tampão fosfato (pH 3,5) e terceira solução - mistura de ácido láctico, ácido fórmico e ácido acético (pH 3,5). As avaliações da presença de íons nas soluções foram feitas no 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º, 14º, 21º e 30º dia de experimento. Os resultados constataram a presença de cobre, zinco, ferro e cromo nas soluções enquanto que os principais constituintes da liga (Au e Pt) não foram detectados. O zinco foi encontrado nas três soluções desde o primeiro dia de imersão. Para a primeira solução, a média de zinco encontrada ao longo do período experimental foi de $124 \pm 6,63$ µg por litro de solução, para a segunda solução esta média foi de $207 \pm 3,27$ µg/L e para a terceira solução a média foi de $146 \pm 6,02$ µg/L.

Estudos epidemiológicos têm mostrado ligação entre problemas cardiovasculares e a exposição ao metal. Muitos estudos toxicológicos *in vivo* avaliam os efeitos da exposição crônica aos metais (Kodavanti et al., 2002). A exposição à partículas de metais via respiração têm sido associada a efeitos adversos à saúde cardiopulmonar (Atkinson et al., 1999; Pope et al., 2002). É de grande importância o estudo das respostas cardiovasculares e pulmonares em decorrência de exposição a agentes tóxicos (Daniels et al., 2000; Pope et al., 2002).

Gilmour e colaboradores (2006) desenvolveram um experimento no qual ratos Wistar machos foram instilados intratraquealmente com solução salina (grupo controle) ou com sulfato de zinco (131 µg/Kg - grupo tratado). Os autores relataram que a alta concentração de zinco utilizada no estudo foi necessária para alterar os níveis de zinco circulantes no sistema, acima do que normalmente é encontrado no organismo, permitindo assim caracterizar os efeitos de uma exposição excessiva ao metal, o que realmente ele pode trazer de prejuízo para o sistema biológico. As avaliações nos animais foram realizadas 1, 4, 24 e 48 horas após a exposição ao metal. Os resultados demonstraram que o nível de zinco aumentou significativamente no tecido pulmonar imediatamente após 1 hora da instilação do sulfato de zinco. No plasma este nível atingiu valor 20% maior do que o controle após 1 hora da exposição. O tecido cardíaco não apresentou diferenças nas concentrações de zinco quando comparadas aos do grupo controle. A concentração total de zinco no fígado aumentou significativamente após o período de 24 horas, mantendo-se elevado após 48 horas. Foram observadas perda de integridade do epitélio pulmonar após 4 horas da exposição, com aumento progressivo após 48 horas. Lesões inflamatórias e degenerativas apareceram nos pulmões dos animais expostos ao zinco. Após 24 horas, as lesões se apresentaram hemorrágicas, com exsudatos e células inflamatórias como neutrófilos e macrófagos. Após 48

horas, essas lesões se tornaram difusas atingindo grande parte do pulmão. No tecido cardíaco foi encontrada inflamação, no entanto, as lesões cardíacas foram mínimas quando comparadas às pulmonares, presença de poucas células inflamatórias, como macrófagos e linfócitos. A exposição excessiva ao metal pode ocasionar danos ao DNA mitocondrial e mudanças na expressão de genes de células cardíacas. Qualquer alteração na concentração de zinco pode trazer uma variedade de efeitos prejudiciais. O estudo comprovou efeitos patológicos do zinco no pulmão e coração.

Wallenborn et al. (2008) relatam que muitas pessoas são expostas a metais pesados em áreas urbanas industriais (metalurgia) através da inalação de vapores. Os autores realizaram um estudo utilizando ratos Wistar machos com 12 semanas de vida. Os animais foram expostos, através de inalação por aerosol, ao sulfato de zinco, em concentrações de 10, 30 ou 100 µg de zinco por litro de solução, durante um período de 5 horas por dia, 3 dias por semana, em um total de 16 semanas. As necropsias dos animais ocorreram 48 horas após a última exposição. Os resultados demonstraram ausência de respostas inflamatórias no pulmão, uma vez que não foram encontradas alterações na contagem de macrófagos e de neutrófilos, nem alterações nos níveis de atividades enzimáticas nas células broncoalveolares. Os resultados demonstraram um aumento de ferritina nas células cardíacas, substância esta cuja função primária é a de acumular o ferro intracelular, protegendo a célula dos efeitos tóxicos do metal livre. Além disso, foram encontradas mudanças na expressão de genes cardíacos envolvidos na regulação de canais iônicos e na coagulação. Embora as alterações nos ratos tenham sido pequenas, elas podem ser extremamente prejudiciais em indivíduos que já apresentem história pregressa de doenças cardiovasculares.

Post et al. (2008) relatam que a esclerose lateral amiotrófica é uma doença debilitante, uma motoneuropatia, que resulta da deteriorização e perda de neurônios motores, é uma doença neurodegenerativa que resulta em paralisia fatal. O potencial neurotóxico de Zn^{+2} , tanto *in vitro* como *in vivo*, tem sido avaliado, no entanto, os mecanismos de toxicidade do zinco permanecem incertos. Há a hipótese de que o zinco, mediante a inibição de neurotrofinas, possa induzir a morte celular. As neurotrofinas são peptídeos expressos em várias regiões do sistema nervoso e atuam por ligação a receptores específicos. As neurotrofinas têm influência no desenvolvimento e sobrevivência dos neurônios, além de exercerem papel protetor e restaurador das funções neuronais. Os autores investigaram o mecanismo neurotóxico do íon metálico (Zn^{+2}), avaliando sua ação na atividade da neurotrofina cerebral (fator neurotrófico derivado do cérebro), mais especificamente na sobrevivência do neurônio motor. Culturas de neurônios motores espinhais de ratos (15 dias

de vida) foram incubados em contato com o fator neurotrófico derivado do cérebro e 100 μM de Zn^{+2} . Os resultados do estudo demonstraram que o zinco levou à morte destes neurônios motores. Isto pode ter ocorrido devido à uma transição na conformação dentro da neurotrofina, inibindo sua atividade de se ligar com o seu principal receptor de sinalização. Este estudo revelou um mecanismo pelo qual a toxicidade do zinco foi mediada por uma perda seletiva de atividade da neurotrofina resultando em morte de neurônios motores.

Elshawahy et al. (2009) realizaram um estudo no qual foram preparadas soluções com sais de metais, como o zinco. Com estas soluções foram feitos testes de citotoxicidade com fibroblastos de ratos incubados durante 7 dias. Quanto menor a porcentagem de células viáveis, maior o índice de citotoxicidade do metal, sendo que o zinco (Zn), cobre (Cu) e níquel (Ni) apresentaram os maiores valores de toxicidade. Os resultados do estudo comprovaram que os metais liberados das ligas metálicas, comumente utilizadas nas estruturas protéticas, mostraram alta evidência de efeitos citotóxicos em culturas de fibroblastos.

Kaisman-Elbaz et al. (2009) relatam que as células de Sertoli exercem papel vital na regulação da espermatogênese, tendo diversas funções como: prover e manter um ambiente apropriado para o desenvolvimento das células germinativas nos testículos; controle da maturação e da migração das células germinativas; síntese de proteínas e esteróides. A produção espermática diária por grama de testículo é utilizada como parâmetro para avaliar a eficiência da espermatogênese. A clusterina é uma glicoproteína produzida pelas células de Sertoli e está associada ao processo de morte celular programada (apoptose). Os metais pesados induzem fisiologicamente a morte celular de células germinativas. O metal pesado à que o testículo é naturalmente exposto é o zinco. Os autores avaliaram a hipótese do Zn^{+2} , em concentrações excessivas, entrar nas células de Sertoli, induzir a secreção de clusterina e aumentar a morte de células germinativas. Utilizando um modelo de estudo *in vitro*, com culturas de células de testículos de ratos, após exposição ao zinco, houve aumento na secreção de clusterina resultando em aumento de morte celular. Os autores relataram que um pequeno aumento de zinco intracelular nas células de Sertoli desencadeou o aumento da expressão e secreção de clusterina. Tendo sido a liberação de clusterina seguida por morte celular, pode-se associar a clusterina aos efeitos tóxicos dos íons de metais pesados. Este mecanismo pode ser então, ativado em decorrência de exposição à metais tóxicos.

Baricević et al. (2010) relatam que devido à corrosão, as aplicações metálicas odontológicas podem levar a efeitos mutagênicos e genotóxicos. Estudo realizado por tais autores, avaliou a genotoxicidade de duas ligas metálicas (Co-Cr-Mo e Ni-Cr) que podem

ficar em contato com o epitélio bucal por 5 anos ou mais. Células da mucosa bucal foram coletadas e processadas para análise. Foi avaliada a viabilidade celular e os efeitos genotóxicos dos íons metálicos no DNA destas células. Os metais liberados de ambas as ligas diminuíram a viabilidade celular e alteraram a estrutura do DNA das mesmas.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente estudo foram:

- estudar histopatologicamente as alterações ocorridas nas estruturas do epitélio adamantino, epitélio juncional, gengiva inserida e ligamento periodontal de ratos cujas mães receberam cloreto de zinco na água do bebedouro, durante a lactação.
- avaliar quantitativamente tais alterações, empregando-se para tal, técnicas morfométricas e estereológicas adequadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e tratamento

Foram utilizados *Rattus norvegicus* (variedade *albinus*) - Wistar machos a partir do primeiro dia de vida pós-natal, os quais foram divididos em dois grupos:

- grupo tratado: cinco filhotes escolhidos ao acaso de ninhadas de 10 lactantes, cujas mães receberam 300 mg de cloreto de zinco por litro de água destilada no bebedouro, durante a lactação.
- grupo controle: cinco filhotes também escolhidos aleatoriamente, cujas mães receberam somente água no bebedouro, durante a lactação.

Durante o período experimental, mães e filhotes foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, em gaiolas com temperatura ambiente de 25 ± 3 °C, umidade relativa de 55 ± 5 % e ciclos claro/escuro de 12/12 horas (início do período claro às 7 horas). As mães tiveram livre acesso à água e ração comercial *ad libitum*.

4.2 Técnica de dissecação e técnica histológica

Após o período experimental (21 dias) os filhotes foram sacrificados pela sobredosagem anestésica com Tribomoetanol (2,2,2 - Tribomoethanol, Aldrich). As cabeças foram separadas dos corpos e imediatamente imersas em solução fixadora de “alfac”, contendo álcool 80% - 85ml, formalina -10ml e ácido acético-5ml, onde permaneceram durante 24 horas a temperatura ambiente, de acordo com a técnica descrita por Gomes et al. (1990). Sequencialmente, o material foi imerso em solução de citrato de sódio 20% e ácido fórmico 30%, em partes iguais, para descalcificação (Morse, 1945). Depois de fixadas e desidratadas, as cabeças foram desarticuladas; o palato foi seccionado em planos frontais, ao nível dos dentes primeiros molares, e incluído em parafina. Foram obtidos cortes seriados, com intervalo de 10 secções, e espessura de 6 µm, os quais foram corados com hematoxilina e eosina.

Com a finalidade de se avaliar quantitativamente as alterações celulares ocorridas no epitélio adamantino, epitélio juncional, gengiva inserida e ligamento periodontal dos ratos, foram utilizadas técnicas cariométricas e estereológicas adequadas.

4.3 Morfometria (Cariometria)

Para a obtenção dos diâmetros maior (D) e o menor (d) dos núcleos das células dos tecidos estudados, os cortes foram focalizados ao microscópio de luz JENAMED com objetiva de imersão (100X), munido de uma câmara clara JENA.

Os núcleos foram projetados sobre o papel com aumento final de 1000X. As imagens obtidas, sendo 50 para cada estrutura estudada, foram então, contornadas com lápis preto número 2, tomando-se o cuidado de considerar somente as imagens bem definidas. Posteriormente, mediu-se o eixo maior (D) e o menor (d) dessas imagens empregando-se uma escala milimetrada.

Uma vez determinados o diâmetro maior (D) e o menor (d) e mediante a utilização de um software, foram estimados os seguintes parâmetros cariométricos (Sala et al., 1994):

- a) Diâmetro geométrico médio: $M = (D \cdot d)^{1/2}$
- b) Relação entre o diâmetro maior e diâmetro menor: D/d
- c) Perímetro: $P = (\pi/2) \cdot [1,5 \cdot (D+d) - M]$
- d) Área: $A = \pi \cdot M^2/4$
- e) Volume: $V = \pi \cdot M^3/6$
- f) Relação entre o volume e a área: $V/A = 2/3 \cdot M$
- g) Coeficiente de forma: $F = 4 \cdot \pi \cdot A / P^2$
- h) Índice de contorno: $I = P/A^{1/2}$
- i) Excentricidade: $E = (D+d)^{1/2} \cdot (D-d)^{1/2} / D$

4.4 Estereologia

Neste trabalho foi utilizada uma grade impressa sobre papel (idealizada por Merz, 1968), onde foram realizados os desenhos.

Figura 1. Representação gráfica da grade idealizada por Merz (1968).

Essa grade consiste em um quadrado de $14400\ \mu\text{m}^2$, o qual limita uma área teste contendo um sistema de 100 pontos marcados sobre 10 linhas sinuosas, formadas por uma sucessão de 10 semicírculos encadeados por linha, conforme indica a figura 1. Cada distância entre dois pontos adjacentes mede $12,40\ \mu\text{m}$ e o comprimento do semicírculo é de $18,79\ \mu\text{m}$, para desenhos com aumento de 1000X.

Os cortes foram focalizados ao microscópio de luz com objetiva de 100X, munido de câmara clara. As imagens obtidas foram desenhadas sobre a grade.

A grade de MERZ pode ser usada tanto para contar pontos sobre uma determinada estrutura histológica, como para contar intersecções entre duas estruturas contíguas, bastando para isso, no primeiro caso, considerar o número de pontos que caem sobre a estrutura em estudo, ou, no segundo caso, o número de vezes em que as superfícies vizinhas cortam a linha curva.

Com a finalidade de se avaliar a relação núcleo/citoplasma, a densidade numérica celular, a relação superfície externa/camada basal, o volume citoplasmático e o volume celular, a espessura das camadas epiteliais estudadas e a densidade de superfície, foi utilizada ora a contagem de pontos (2000 por animal, correspondentes ao produto de 20 campos microscópicos por 100 pontos da grade), ora o número de intersecções e aplicados às equações estereológicas apropriadas para cada uma dessas variáveis.

Para a avaliação da relação núcleo/citoplasma, dos volumes relativos citoplasmáticos e celulares, dos volumes celulares e citoplasmáticos e das densidade numérica das fibras do ligamento periodontal foi feita a contagem de pontos e aplicada às equações estereológicas apropriadas para cada uma das variáveis.

a) Relação Núcleo/Citoplasma (N/C)

A relação núcleo/citoplasma é dada pela relação entre os volumes relativos do núcleo e do citoplasma, expressa pela equação:

$$N/C = \frac{V_{vn}}{V_{vcit}}$$

Os volumes relativos foram determinados pelo número de pontos que incidiram sobre as estruturas consideradas, em relação ao número total de pontos contidos na área teste (Delèsse, 1948; Chalkley, 1943; Weibel, 1969).

Na verdade, o valor assim obtido é uma sobrestimação do valor real, devido ao chamado “efeito Holmes” (Weibel, 1969), o qual decorre do uso de cortes histológicos com espessura finita. Essa sobrestimação pode ser corrigida, levando-se em consideração o tamanho da estrutura envolvida e a espessura do corte histológico. Dessa forma, a seguinte equação foi proposta (Hennig, 1957) para a correção do efeito Holmes, considerando os núcleos como esferas de diâmetro médio D e sendo T a espessura do corte:

$$V_{vc} = \frac{V_{vn}}{1 - 3T / 2D}$$

Nessa expressão V_{vc} é a fração volumétrica corrigida dos núcleos e V_{vn} é a fração volumétrica observada, calculada pela divisão do número de pontos que incidem sobre os núcleos, pelo número total de pontos que recaem sobre o núcleo e sobre o citoplasma. O valor do diâmetro médio (D) é o mesmo já determinado previamente, com o emprego da cariometria.

A relação núcleo/citoplasma corrigida será então:

$$N/C \text{ corrigida} = \frac{V_{vc}}{1 - V_{vc}}$$

sendo $1 - V_{vc}$ a fração volumétrica citoplasmática corrigida (V_{vcit}).

b) Densidade Numérica Celular (Nv)

A densidade numérica das células epiteliais, que corresponde ao número de células por mm³ de tecido, foi determinada dividindo-se o volume relativo (Vv) das células em questão, pelo volume celular médio (Vcel) (Sala et al., 1992):

$$Nv = (Vv / Vcel). 10^9$$

O fator 10⁹ é usado para expressar os resultados em números por mm³, uma vez que, os volumes médios das células estão expressos em μm³ (10⁹μm³= 1 mm³).

c) Relação Superfície Externa/ Camada Basal (V/S)

Para determinar esta relação, foi contado o número de vezes em que ocorreu a intersecção da linha-teste com a interface que se desejava estudar (ceratina ou conjuntivo).

A relação V/S é dada pela equação:

$$V/S = \frac{P.L}{4.I}$$

onde P é o número de pontos que recaem sobre o epitélio, I o número de intersecções da linha-teste com a interface considerada e L o comprimento da linha-teste determinada pela relação:

$$L = \frac{d. \pi}{2}$$

onde d é a distância entre dois pontos contíguos, marcados sobre a linha-teste.

O fato de o volume epitelial (Vep) ser constante para cada campo torna-se possível estabelecer uma relação direta entre áreas das superfícies das duas interfaces correspondentes ao mesmo volume padrão:

$$\frac{IK / Vep}{Ict / Vep} = \frac{IK}{Ict}$$

onde IK e Ict são números de intersecções da linha-teste com a interface epitélio/ceratina e epitélio/conjuntivo, respectivamente.

A relação V/S foi invertida para obter a relação IK / Ict ao invés de Ict / IK.

d) Volume Citoplasmático e Volume da Célula Epitelial (Vct e Vcel)

O volume citoplasmático (Vct) foi estimado a partir do volume nuclear e da relação núcleo/citoplasma (N/C) corrigida, já avaliados. A soma dos volumes nuclear e citoplasmático médios, por sua vez, forneceu o valor estimado para a célula epitelial “média” (Sala et al., 1992).

O volume citoplasmático é dado pela relação:

$$V_{ct} = \frac{V_n}{N/C \text{ corrigida}}$$

O volume da célula epitelial, por sua vez, é fornecido pela equação:

$$V_{cel} = V_n + V_{ct}$$

e) Espessura Média do Epitélio (E)

A espessura das camadas epiteliais (E) das estruturas estudadas foi estimada mediante o método de Weibel (1969):

$$E = \frac{Pe.L}{2 (IK + Ict)}$$

onde Pe é o número de pontos que ficaram sobre o epitélio, L o comprimento da linha-teste, IK e Ict foram o número de intersecções das linhas-teste com a interface epitélio/ceratina e com a interface epitélio/conjuntivo, respectivamente.

f) Densidade de Superfície (Su)

A densidade de superfície representa a superfície de um componente tecidual por unidade de volume do tecido. Esse parâmetro foi estimado pelo método estereológico de Tomkeieff (1945), segundo o qual a densidade de superfície de um componente (Su) é

proporcional ao número de intersecções (li) das linhas-teste com a superfície estimada e inversamente proporcional ao comprimento das linhas-teste (Lt):

$$Su = \frac{2.li}{Lt}$$

O método acima descrito foi utilizado para estimar as densidades de superfície das estruturas estudadas de animais dos grupos controle e tratado.

g) Volume Relativo (Vv)

Com a finalidade de se avaliar percentualmente as estruturas do periodonto, empregou-se a técnica de Chalkey (1943), cuja fórmula é:

$$Vv = (Pn + Pct) / Pt$$

onde Pn são os pontos contados sobre o núcleo da estrutura, Pct são os pontos sobre o citoplasma e Pt são os pontos totais.

h) Volume Relativo Nuclear (Vvn)

O volume nuclear relativo é dado pela fórmula:

$$Vvn = Pn / (Pn + Pct) \cdot [2M / (2M + 3t)]$$

onde Pn e Pct são respectivamente, o número de pontos que coincidiram sobre o núcleo e sobre o citoplasma das células das estruturas estudadas; M é o diâmetro nuclear médio e t é a espessura do corte histológico.

i) Volume Relativo Citoplasmático (Vvct)

O volume relativo citoplasmático é dado pela fórmula:

$$Vvct = 1 - Vvn$$

onde Vvn é o volume relativo nuclear.

4.5 Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados deste trabalho, foi utilizado teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney. Para os diversos cálculos matemáticos envolvidos nos estudos morfométricos e estereológicos foram utilizados diversos programas para computador do tipo IBM-PC, em linguagem BASIC AVANÇADO (BÁSICA), elaborados pelos Profs. Drs. Geraldo Maia Campos e Miguel Angel Sala Di Matteo, do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.

5. RESULTADOS

5.1 Peso Corporal

No presente estudo foi observado que o peso corporal dos filhotes de ratas tratadas com zinco durante a lactação foi significativamente menor que o peso dos filhotes das mães controles. O peso corporal médio, ao final dos 21 dias de lactação, foi de 60,00 g para o grupo controle e de 43,00 g para o grupo tratado (Tabela 1).

Tabela 1 - Pesos corporais (em gramas) dos filhotes controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação e respectivas médias. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney; (* $p < 0,01$).

C	T
62,00	47,00
58,00	36,00
64,00	44,00
56,00	45,00
60,00	43,00
$\bar{X}$	$\bar{X}$
60,00	43,00*

5.2 Histopatologia

5.2.1 Epitélio Adamantino e Epitélio Juncional

A análise histopatológica permitiu observar, no grupo controle, o epitélio juncional em formação e mais superficialmente o epitélio adamantino (Figura 1). O epitélio juncional era de tipo estratificado pavimentoso, constituído por camada basal e camada espinhosa, enquanto que o epitélio adamantino, mais delgado, era constituído por uma camada de fibras cilíndricas (Figura 1).

Nos filhotes do grupo tratado com zinco, o epitélio juncional apresentou-se desorganizado e com espessura reduzida, enquanto que o epitélio adamantino mostrou-se funcional, porém constituído de células mais baixas (Figura 2).

Figura 1. Aspecto histológico do epitélio juncional e epitélio adamantino do rato controle. H.E. (1000X).

Figura 2. Aspecto histológico do epitélio juncional e epitélio adamantino do rato tratado. Notar a desorganização epitelial. H.E. (1000X).

5.2.2 Gengiva Inserida

No grupo controle, o estudo histopatológico constatou uma gengiva inserida bem desenvolvida, constituída por camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea, bem evidentes (Figura 3). Nos filhotes do grupo tratado, o epitélio da gengiva inserida apresentou as mesmas camadas, porém, com espessura, aparentemente, reduzida (Figura 4).

Figura 3. Aspecto histológico da gengiva inserida do rato controle. H.E. (1000X).

Figura 4. Aspecto histológico da gengiva inserida do rato tratado. Notar menor espessura do epitélio. H.E. (1000X).

5.2.3 Ligamento Periodontal

No grupo controle foi verificado, histologicamente, que o ligamento periodontal apresentou fibras bem desenvolvidas e estruturadas, inseridas no osso alveolar e no cimento, com núcleos evidentes e volumosos (Figura 5A). Nos filhotes do grupo tratado foi possível observar que as fibras periodontais apresentaram-se mais compactadas e desorganizadas, além de uma redução do espaço periodontal (Figura 5B).

Figuras 5A e 5B: Aspecto histológico das fibras periodontais e tecido conjuntivo vascularizado do ligamento periodontal do rato controle (**5A**) e aspecto histológico das fibras periodontais e tecido conjuntivo vascularizado do rato tratado. Notar fibras mais compactadas e espaço periodontal reduzido (**5B**). H.E. (1000X).

5.3 Morfometria (Cariometria)

5.3.1 Epitélio Adamantino

O estudo histométrico dos núcleos das células do epitélio adamantino dos filhotes do grupo tratado com zinco permitiu evidenciar que os diâmetros (maior, menor e médio) foram

significativamente menores que os dos filhotes do grupo controle (Tabela 2). A análise estatística demonstrou diferenças altamente significantes ($p < 0,01$) para esses parâmetros nucleares entre os dois grupos considerados.

A diferença dos tamanhos nucleares entre os grupos estudados, avaliada pelos diâmetros, foi confirmada pelos resultados obtidos com a estimação do perímetro, área, volume e relação V/A dos núcleos do epitélio adamantino. Assim, todos estes parâmetros foram menores nos núcleos do epitélio adamantino dos animais do grupo tratado (Tabela 2). A análise estatística evidenciou que as diferenças foram altamente significantes ($p < 0,01$) entre os dois grupos estudados.

Os resultados obtidos para os parâmetros que definem a forma dos núcleos (relação D/d, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno) não apresentaram diferenças significantes entre os grupos controle e tratado para os núcleos deste epitélio (Tabela 2).

5.3.2 Epitélio Juncional

A histometria dos núcleos das células da camada basal do epitélio juncional demonstrou que os diâmetros (maior, menor e médio), o perímetro, a área, o volume e a relação volume/área foram significativamente menores nos filhotes do grupo tratado com zinco do que nos do grupo controle (Tabela 3). A análise estatística evidenciou, então, que os núcleos das células desta camada sofreram uma diminuição altamente significativa de tamanho ($p < 0,01$) no grupo tratado (Tabela 3).

Os parâmetros que avaliaram a forma nuclear (relação D/d, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno) não mostraram diferenças significantes entre os grupos controle e tratado para os núcleos da camada basal do epitélio juncional (Tabela 3).

A morfometria dos núcleos da camada espinhosa do epitélio juncional evidenciou que o tamanho, avaliado pelos os diâmetros (maior, menor e médio), perímetro, área, volume e relação volume/área, foi significativamente menor nos animais do grupo tratado com zinco do que nos do grupo controle (Tabela 4). A análise estatística demonstrou que o tratamento com zinco durante a lactação provocou uma diminuição altamente significativa ($p < 0,01$) de tamanho nos núcleos das células desta camada para o grupo tratado.

Os parâmetros que avaliaram a forma nuclear (relação D/d, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno) não mostraram diferenças significantes entre os grupos controle e tratado para os núcleos da camada espinhosa do epitélio juncional (Tabela 4).

5.3.3 Gengiva Inserida

O estudo histométrico dos núcleos das células da camada basal do epitélio da gengiva inserida permitiu verificar que os diâmetros (maior, menor e médio), o perímetro, a área, o volume e a relação volume/área foram significantemente menores nos animais tratados com zinco que nos animais controles (Tabela 5). A análise estatística evidenciou que as diferenças entre os tamanhos nucleares das células desta camada foram significantes ($p < 0,05$ para diâmetro maior e diâmetro menor; $p < 0,01$ para diâmetro médio, perímetro, área, volume e relação volume/área) entre os dois grupos considerados.

A análise histométrica das formas dos núcleos da camada basal da gengiva inserida não demonstrou a existência de diferenças significantes entre os grupos controle e tratado (relação D/d, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno) (Tabela 5).

A Tabela 6 apresenta os resultados correspondentes aos valores histométricos médios estimados para os núcleos da camada espinhosa do epitélio da gengiva inserida dos animais controles e tratados. Foi possível observar que os núcleos desta camada diminuíram significantemente de tamanho nos animais do grupo tratado. A análise estatística demonstrou então, que o tratamento com zinco durante a lactação, causou uma redução significativa do diâmetro maior, diâmetro menor, diâmetro médio, perímetro, área, volume e relação V/A ($p < 0,01$) para os núcleos do grupo tratado.

A análise da forma dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio da gengiva inserida somente mostrou diferença significativa ($p < 0,05$) para a excentricidade, enquanto que os outros parâmetros (relação D/d, coeficiente de forma e índice de contorno) não apresentaram diferenças significantes entre os grupos controle e tratado (Tabela 6).

Na Tabela 7 é possível observar a existência de diferenças nos tamanhos nucleares das células da camada granulosa do epitélio da gengiva inserida, avaliados pelos diâmetros (maior, menor e médio), perímetro, área, volume e relação V/A, entre os animais pertencentes aos grupos controle e tratado com zinco. A análise estatística demonstrou que a ação do zinco durante a lactação provocou uma diminuição significativa do tamanho nuclear na camada

granulosa do epitélio da gengiva inserida ($p < 0,05$ para o diâmetro maior e $p < 0,01$ para o diâmetro menor, diâmetro médio, perímetro, área, volume e relação V/A).

A análise da forma nuclear das células desta camada não demonstrou a existência de diferença significativa entre os grupos controle e tratado (relação D/d, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno) (Tabela 7).

5.3.4 Ligamento Periodontal

O estudo cariométrico realizado no ligamento periodontal revelou a existência de diferenças nos tamanhos nucleares das fibras periodontais, revelada pelo diâmetro maior, diâmetro médio, área, relação V/A ($p < 0,01$) e perímetro ($p < 0,05$), entre os filhotes dos grupos controle e tratado (Tabela 8). A análise estatística demonstrou que o zinco durante a lactação causou uma diminuição significativa do tamanho nuclear das fibras do ligamento periodontal. A análise da forma nuclear (relação D/d, excentricidade, coeficiente e forma e índice de contorno) das fibras do ligamento periodontal não evidenciou a existência de diferença significativa entre os grupos considerados (Tabela 8).

Tabela 2 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células do epitélio adamantino do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$).

Parâmetros	C	T
Diâmetro maior (μm)	7,88	5,64*
Diâmetro menor (μm)	5,87	4,24*
Diâmetro médio (μm)	6,79	4,87*
Relação D/d	1,35	1,37
Perímetro (μm)	21,75	15,65*
Área (μm^2)	36,72	23,00*
Volume (μm^3)	172,07	63,09*
Relação V/A	4,52	3,24*
Excentricidade	0,60	0,53
Coeficiente de forma	0,96	0,95
Índice de contorno	3,62	3,63

Tabela 3 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada basal do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$).

Parâmetros	C	T
Diâmetro Maior (μm)	8,14	6,16*
Diâmetro Menor (μm)	6,12	4,56*
Diâmetro Médio (μm)	7,05	5,29*
Relação D/d	1,34	1,39
Perímetro (μm)	22,55	17,01*
Área (μm^2)	39,34	22,19*
Volume (μm^3)	188,63	80,58*
Relação V/A	4,69	3,51*
Excentricidade	0,60	0,57
Coefficiente de Forma	0,96	0,95
Índice de Contorno	3,61	3,64

Tabela 4 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$).

Parâmetros	C	T
Diâmetro Maior (μm)	8,37	6,52*
Diâmetro Menor (μm)	5,95	4,57*
Diâmetro Médio (μm)	7,05	5,45*
Relação D/d	1,43	1,49
Perímetro (μm)	33,71	17,46*
Área (μm^2)	39,36	22,99*
Volume (μm^3)	189,69	84,74*
Relação V/A	4,68	3,57*
Excentricidade	0,64	0,68
Coefficiente de Forma	0,94	0,93
Índice de Contorno	3,65	3,66

Tabela 5 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada basal do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

Parâmetros	C	T
Diâmetro Maior (μm)	8,84	7,32**
Diâmetro Menor (μm)	6,27	5,36**
Diâmetro Médio (μm)	7,42	6,26*
Relação D/d	1,44	1,38
Perímetro (μm)	23,97	20,09*
Área (μm^2)	43,58	31,03*
Volume (μm^3)	220,08	132,81*
Relação V/A	4,93	4,16*
Excentricidade	0,63	0,37
Coeficiente de Forma	0,94	0,95
Índice de Contorno	3,65	3,63

Tabela 6 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

Parâmetros	C	T
Diâmetro Maior (μm)	9,03	6,60*
Diâmetro Menor (μm)	6,83	5,24*
Diâmetro Médio (μm)	7,84	5,87*
Relação D/d	1,34	1,26
Perímetro (μm)	25,08	18,76*
Área (μm^2)	48,74	27,89*
Volume (μm^3)	168,47	113,69*
Relação V/A	5,21	3,94*
Excentricidade	0,57	0,50**
Coeficiente de Forma	0,96	0,97
Índice de Contorno	3,62	3,59

Tabela 7 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada granulosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

Parâmetros	C	T
Diâmetro Maior (μm)	8,24	6,99**
Diâmetro Menor (μm)	6,02	4,86*
Diâmetro Médio (μm)	7,03	5,76*
Relação D/d	1,39	1,75
Perímetro (μm)	22,61	18,83*
Área (μm^2)	39,52	26,94*
Volume (μm^3)	194,57	108,53*
Relação V/A	4,67	3,86*
Excentricidade	0,60	0,64
Coefficiente de Forma	0,95	0,93
Índice de Contorno	3,63	3,66

Tabela 8 - Valores cariométricos médios dos núcleos das fibras do ligamento periodontal do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

Parâmetros	C	T
Diâmetro Maior (μm)	7,38	6,19*
Diâmetro Menor (μm)	4,70	4,16
Diâmetro Médio (μm)	5,82	5,06*
Relação D/d	1,61	1,53
Perímetro (μm)	19,27	16,46**
Área (μm^2)	27,41	20,57*
Volume (μm^3)	90,57	72,96
Relação V/A	3,90	3,36*
Excentricidade	0,73	0,69
Coefficiente de Forma	0,91	0,92
Índice de Contorno	3,71	3,68

5.4 Estereologia

5.4.1 Epitélio Adamantino

A análise estereológica do epitélio adamantino do 1º molar superior demonstrou que houve uma redução significativa ($p<0,01$) do volume celular, assim como da relação N/C nos filhotes dos animais tratados com zinco durante a lactação (Tabela 9). O volume citoplasmático médio e a espessura do epitélio adamantino, por sua vez, não apresentaram diferenças significantes entre os dois grupos (Tabela 9). A densidade numérica das células deste epitélio foi significativamente maior nos animais do grupo tratado ($p<0,01$) (Tabela 9).

5.4.2 Epitélio Juncional

A análise estereológica da camada basal do epitélio juncional demonstrou que houve uma diminuição significativa ($p<0,01$) do volume celular e volume citoplasmático para o grupo tratado, assim como, para este grupo, a relação N/C foi também significativamente menor ($p<0,05$) que no grupo controle (Tabela 10).

A estimativa estereológica da camada basal do epitélio juncional revelou uma diminuição significativa da espessura no grupo tratado ($p<0,01$), quando comparada ao do grupo controle. A densidade numérica das células desta camada foi, por sua vez, significativamente maior no grupo tratado ($p<0,01$) do que no controle (Tabela 10).

A camada espinhosa do epitélio juncional apresentou diferenças significantes, entre os grupos controle e tratado, para todos os parâmetros estereológicos estimados (Tabela 11). Foi demonstrada uma diminuição significativa ($p<0,01$) do volume celular, volume citoplasmático, relação N/C e espessura nos filhotes do grupo tratado com zinco, já para a densidade numérica celular foi ao contrário, sendo o maior valor encontrado para o grupo tratado ($p<0,01$).

Na Tabela 12 pode-se verificar que a espessura total do epitélio juncional foi significativamente menor nos animais tratados que nos controles ($p<0,01$). A densidade numérica, ao contrário, apresentou valor significativamente maior no grupo tratado do que no

grupo controle ($p < 0,01$). Por sua vez, a densidade de superfície e a relação superfície externa/superfície basal não mostraram diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos estudados (Tabela 12).

5.4.3 Gengiva Inserida

O estudo estereológico do epitélio da gengiva inserida não demonstrou a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle e tratado para os seguintes parâmetros da camada basal: volume citoplasmático, volume celular, e densidade numérica celular (Tabela 13). Por sua vez, a relação N/C e a espessura da camada celular foram significativamente menores ($p < 0,01$) nos filhotes dos animais tratados com zinco do que nos animais controles (Tabela 13).

A estimativa estereológica da camada espinhosa do epitélio da gengiva inserida demonstrou uma diminuição significativa do volume celular, volume citoplasmático e espessura ($p < 0,01$) no grupo de animais tratados, quando comparados aos do grupo controle (Tabela 14). A densidade numérica das células desta camada foi significativamente maior no grupo tratado ($p < 0,01$) do que no grupo controle (Tabela 14). A relação N/C, por sua vez, não mostrou diferença significativa entre os dois grupos considerados (Tabela 14).

As células da camada granulosa do epitélio da gengiva inserida não apresentaram diferenças significantes entre os grupos controle e tratado para os seguintes parâmetros estereológicos: volume celular, volume citoplasmático, espessura e densidade numérica celular (Tabela 15). Somente foi demonstrada uma diminuição significativa ($p < 0,05$) para a relação N/C no grupo tratado em relação ao grupo controle (Tabela 15).

Na Tabela 16 pode-se constatar diferença para a espessura total do epitélio da gengiva inserida, que foi significativamente menor nos animais tratados que nos controles ($p < 0,05$). A densidade de superfície ($p < 0,05$) e a densidade numérica celular ($p < 0,01$), ao contrário, foram significativamente maiores no grupo tratado do que no grupo controle ($p < 0,01$). A relação superfície externa/superfície basal, por sua vez, não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos estudados (Tabela 16).

5.4.4 Ligamento Periodontal

A análise estereológica do ligamento periodontal permitiu verificar a existência de diferenças estatisticamente significantes entre os grupos controle e tratado para o volume citoplasmático, volume celular e para a densidade numérica celular (Tabela 17). Os dois primeiros parâmetros tiveram uma diminuição altamente significativa no grupo tratado ($p < 0,01$), enquanto que a densidade numérica celular mostrou um aumento significativo neste grupo ($p < 0,05$). Por sua vez, a relação N/C não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de animais (Tabela 17).

Tabela 9 - Valores médios do volume citoplasmático, volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular do epitélio adamantino do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$).

Parâmetros	C	T
Volume Citoplasmático (μm^3)	88,71	75,51
Volume Celular (μm^3)	228,41	115,09*
Relação N/C	0,33	0,19*
Espessura (μm)	7,35	6,76
Densidade Numérica ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	4,54	10,78*

Tabela 10 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular das células da camada basal do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

Parâmetros	C	T
Volume Citoplasmático (μm^3)	135,73	54,82*
Volume Celular (μm^3)	288,73	113,88*
Relação N/C	0,35	0,22**
Espessura (μm)	11,29	6,87*
Densidade Numérica ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	3,60	9,50*

Tabela 11 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular das células da camada espinhosa do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$).

Parâmetros	C	T
Volume Citoplasmático (μm^3)	210,85	87,64*
Volume Celular (μm^3)	389,06	146,70*
Relação N/C	0,20	0,15*
Espessura (μm)	27,59	15,94*
Densidade Numérica ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	2,76	7,42*

Tabela 12 - Valores médios da densidade de superfície, da espessura total do epitélio, da relação superfície externa/camada basal e da densidade numérica celular do epitélio juncional total do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$).

Parâmetros	C	T
Densidade de Superfície (mm^2/mm^3)	2,42	3,12
Espessura Total do Epitélio (μm)	34,05	28,21*
Relação Superfície Externa/Camada Basal	0,85	0,75
Densidade Numérica ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	2,94	8,10*

Tabela 13 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular das células da camada basal do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$).

Parâmetros	C	T
Volume Citoplasmático (μm^3)	122,55	385,06
Volume Celular (μm^3)	302,14	501,92
Relação N/C	0,36	0,19*
Espessura (μm)	10,40	7,33*
Densidade Numérica ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	3,40	4,06

Tabela 14 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular das células da camada espinhosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$).

Parâmetros	C	T
Volume Citoplasmático (μm^3)	362,34	129,15*
Volume Celular (μm^3)	577,33	213,66*
Relação N/C	0,19	0,16
Espessura (μm)	44,03	29,28*
Densidade Numérica ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	1,78	4,92*

Tabela 15 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular das células da camada granulosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (** $p < 0,05$).

Parâmetros	C	T
Volume Citoplasmático (μm^3)	512,68	238,84
Volume Celular (μm^3)	478,97	323,35
Relação N/C	0,20	0,11**
Espessura (μm)	12,71	17,46
Densidade Numérica ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	2,48	3,32

Tabela 16 - Valores médios da densidade de superfície, da espessura total do epitélio, da relação superfície externa/camada basal e da densidade numérica celular do epitélio total da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

Parâmetros	C	T
Densidade de Superfície (mm^2/mm^3)	1,04	1,57**
Espessura Total do Epitélio (μm)	131,68	58,02**
Relação Superfície Externa/Camada Basal	0,71	0,78
Densidade Numérica ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	2,02	4,76*

Tabela 17 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma e da densidade numérica celular das células do ligamento periodontal do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney (* $p < 0,01$; ** $p < 0,05$).

Parâmetros	C	T
Volume Citoplasmático (μm^3)	297,44	134,24*
Volume Celular (μm^3)	381,95	186,95*
Relação N/C	0,08	0,10
Densidade Numérica ($\text{N} \times 10^6/\text{mm}^3$)	2,94	5,72**

6. DISCUSSÃO

A ingestão diária de minerais pelas mães, através de alimentos e bebidas, influencia na concentração destes elementos no leite materno (Rossipal e Krachler, 1998). Durante a lactação, uma quantidade substancial de zinco é transportada através da glândula mamária para o leite (Kelleher e Lönnnerdal, 2003). No presente estudo foram utilizados ratos no período de lactação, período este de 21 dias. O zinco presente na água do bebedouro ingerido pelas mães atingiu os tecidos bucais dos respectivos filhotes através do leite materno. Neste estudo não foram avaliados os efeitos do metal nas mães. Os pesos corporais médios dos filhotes tratados com cloreto de zinco mostraram-se diminuídos comparados aos controles.

Através das análises histológicas, morfométricas e estereológicas, o presente estudo avaliou os tecidos periodontais dos filhotes e as possíveis alterações ocasionadas pelo metal nestes tecidos. O epitélio adamantino do grupo tratado com zinco mostrou-se com células menos volumosas, fato que refletiu-se no maior número de células por mm^3 de tecido. Os núcleos apresentaram valores menores para os diâmetros maior, menor e médio; perímetro, área, volume e relação volume/área. Os valores estimados para os parâmetros excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno indicaram ausência de alterações nas formas dos núcleos.

A camada basal do epitélio juncional do 1º molar superior do rato tratado apresentou-se mais delgada e, estereologicamente, foi possível constatar uma menor espessura desta camada, além de demonstrar que as células basais estavam menos volumosas, com citoplasma mais escasso, refletindo-se numa maior densidade numérica (maior número de células por mm^3 de tecido). Foi possível também observar alteração na relação N/C. Os núcleos, avaliados cariometricamente, mostraram valores diminuídos para os diâmetros maior, menor e médio; perímetro, área, volume e relação volume/área. Os valores observados para os parâmetros excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno mostraram valores sem diferenças significantes entre os grupos controle e tratado, indicando ausência de alterações de formas dos núcleos.

Estereologicamente, a camada espinhosa do epitélio juncional do grupo tratado comportou-se de modo similar à camada basal, com redução da espessura, células menos volumosas, com citoplasma mais escasso e aumento da densidade numérica das células, além de alteração na relação N/C. Os núcleos do grupo tratado, após avaliação cariométrica, mostraram valores diminuídos para os diâmetros maior, menor e médio; perímetro, área, volume e relação volume/área; os parâmetros para as formas dos núcleos não mostraram alterações significantes. A espessura total do epitélio juncional apresentou-se diminuída, associada a um aumento da densidade numérica celular.

O epitélio da gengiva inserida, no grupo tratado, apresentou-se menos espesso. As camadas basal e espinhosa, analisadas estereologicamente, mostraram-se mais delgadas, o que não foi observado para a camada granulosa. Na camada basal foi também observado alteração na relação N/C. O volume citoplasmático e o volume celular apresentaram-se reduzidos, levando a um aumento da densidade numérica celular. Na camada granulosa a alteração encontrada foi na relação N/C. A espessura total do epitélio apresentou-se reduzida, com aumento da densidade de superfície e da densidade numérica celular. Os núcleos revelaram-se menores junto às camadas basal, espinhosa e granulosa, confirmados pelos valores diminuídos para diâmetros menor, maior e médio; perímetro, área, volume e relação V/A, obtidos através da cariometria. Já para as formas dos núcleos, somente o parâmetro de excentricidade da camada espinhosa mostrou-se menor, assinalando um achatamento nuclear.

O ligamento periodontal apresentou-se desorganizado no grupo tratado com zinco. Os volumes citoplasmático e celular apresentaram-se diminuídos, além de densidade numérica celular aumentada, confirmados após estereologia. Os núcleos das fibras mostraram-se menores, confirmados pelos valores reduzidos do diâmetro maior e diâmetro médio, bem como da área e do perímetro, obtidos pela cariometria. Para os parâmetros relacionados à forma dos núcleos, excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno não apresentaram alterações significantes.

Nem todos os parâmetros avaliados apresentaram diferenças significantes entre os grupos controle e tratado, no entanto, todas as alterações encontradas indicam uma ação prejudicial do metal, determinando uma desorganização dos tecidos periodontais.

Os fibroblastos tendem a ser células mais suscetíveis à ação tóxica dos materiais dentários que outros tipos celulares. A toxicidade de íons metálicos em uma linhagem de células depende de diferenças metabólicas específicas, como a produção de proteínas e as reações que ocorrem com os íons metálicos, ou seja, esta citotoxicidade depende da linhagem de células utilizada no estudo (Wataha et al., 1994).

O zinco é capaz de induzir a síntese de prostaglandina E_2 (PGE_2), um mediador proinflamatório. A PGE_2 liberada leva a vasodilatação, aumenta a permeabilidade vascular e altera a função da célula imunológica (Schmalz et al., 1997).

A exposição ao zinco reduz a viabilidade celular bem como estimula a produção de IL-6 pelas células expostas a ele. Sugere-se que os íons metálicos estejam envolvidos em atividade proinflamatória. A IL-6 e a PGE_2 são dois possíveis mediadores de inflamação gengival e periodontal (Schmalz et al., 1998).

Mudanças na síntese e nos níveis de substâncias celulares envolvidas em reações inflamatórias podem ser indicadores de efeitos biológicos adversos dos materiais dentários (Schmalz et al., 2000). O metal presente nas estruturas metálicas juntamente com a presença de biofilme nos tecidos, poderá desencadear bem como acentuar uma doença periodontal já existente. Schmalz et al. (1998) reafirmam que observações clínicas de reações teciduais locais como gengivite e periodontite podem estar relacionadas aos efeitos dos cátions metálicos liberados nos tecidos circundantes. O metal também pode ocasionar mudança na morfologia celular, diminuição na proliferação celular o que reduz a espessura do respectivo tecido, bem como diminuição da viabilidade celular. Há evidência de que os efeitos citotóxicos do metal em soluções de sais metálicos sejam causados por seus correspondentes cátions (Schmalz et al., 1998).

Cultura de células alveolares tipo II foram expostas à discos de metais pesados. A análise morfológica da superfície celular, com microscopia eletrônica de varredura, mostrou alterações leves a graduais na superfície da membrana, apresentando expansões em forma de bolhas e destruição das microvilosidades (Takano et al., 2002).

A proliferação dos osteoblastos é aumentada quando discos de compostos cerâmicos contendo zinco são imersos em culturas de tais células, comparado às culturas controles. O aumento da taxa de crescimento dos osteoblastos é proporcional ao aumento da liberação de zinco dos compostos. A concentração de 3,53 mg/L de zinco levou ao aumento da atividade da fosfatase alcalina óssea. Ainda não há um consenso sobre os mecanismos que afetam esta proliferação celular (Ito et al., 2000).

O zinco interfere no processo normal de amelogenese, ou seja, ele compromete a formação do esmalte dental (Gerlach et al., 2000). As metaloproteinases (MPPs) da matriz tem suas atividades inibidas por excesso de zinco. Essas enzimas são secretadas por células como queratinócitos, macrófagos e fibroblastos; contém íons zinco em seus sítios de ação e requerem íons cálcio para suas atividades. Os íons metálicos divalentes inibem a atividade de algumas metaloproteinases que são necessárias para remover as proteínas da matriz de esmalte durante a sua maturação, resultando em um tecido altamente mineralizado. Várias MPPs são expressas nos tecidos dentais em formação, sendo detectadas na camada de odontoblastos. Inibidores de MMPs levam a um aumento na espessura da camada de pré-dentina e a um decréscimo na mineralização da dentina. Os estudos levam a concluir que o zinco interfere na formação dos tecidos dentários, embora estes trabalhos não sejam, especificamente, sobre o periodonto (Souza et al., 2001).

Os íons de zinco são incorporados nos sítios de cálcio na unidade de hidroxiapatita da dentina. Estes íons substituem cálcio nos cristais de hidroxiapatita tratados com cloreto de zinco (ZnCl_2). Há dois tipos de sítios de cálcio na hidroxiapatita chamados de Ca(I) e Ca(II), sendo que o zinco possui maior afinidade pelo sítio Ca (II). O zinco incorporado na hidroxiapatita acarreta instabilidade na estrutura dos cristais de hidroxiapatita (Ito et al., 2000; Takatsuka et al., 2005; Tang et al., 2009).

Os alvos da ação tóxica dos metais são os processos bioquímicos que ocorrem nas células, especificamente as enzimas e/ou membranas de células e organelas. O efeito tóxico do metal envolve, geralmente, interação entre o metal livre na forma de íon com o sítio alvo. A toxicidade é determinada pela dose do metal nos níveis moleculares/celulares e assim, fatores como a forma química e a capacidade de ligação do metal tornam-se críticos (Klaasen, 1996 *apud* Alves e Della Rosa, 2003).

Cátions metálicos bivalentes podem alterar a estrutura do DNA o que faz dos íons, potentes moduladores da função do DNA. Metais com forte afinidade por base perturbam a ligação de hidrogênio entre pares de bases. Os cátions metálicos ligam-se preferencialmente às regiões GC do que regiões AT. O sítio N7 da guanina é reconhecido como um importante sítio de interação do metal. A condensação do DNA é importante para a sua função de transmitir e proteger a informação genética (Duguid et al., 1993; Gao et al., 1993). O metal induz à fragmentação do DNA, com sinais morfológicos de apoptose, aumento do citoplasma e do núcleo celular, destruição de organelas, rompimento das membranas celulares bem como indícios de necrose (Deng e Bloomfield, 1999). A condensação do DNA pode ser induzida pela adição de agentes condensadores em soluções aquosas de DNA. As interações específicas dependem da estrutura do agente condensador (Schedle et al., 1995).

Substâncias citotóxicas afetam a estrutura de células e organelas. Os metais podem diminuir o número e o tamanho das mitocôndrias, alterar a forma dos núcleos, tornando-os irregulares, diminuir o ATP intracelular, diminuir a síntese de RNA e de proteínas. A exposição de fibroblastos gengivais humanos às ligas metálicas provoca mudanças morfológicas detectadas por microscopia eletrônica. Essas mudanças ultraestruturais estão associadas às alterações bioquímicas. Os mecanismos de toxicidade dos íons metálicos podem ser agrupados em três principais que são: bloqueio de grupos de biomoléculas com funções essenciais; deslocamento de íons essenciais de suas respectivas biomoléculas e modificação da conformação ativa das biomoléculas (Messer et al., 1999).

Os íons metálicos podem afetar a função das mitocôndrias. A função mitocondrial de fibroblastos de tecido gengival humano, expostos à soluções de sais dos metais sofreu

alterações. Esses metais atuam inativando o ATP, mais especificamente, diminuindo a atividade de enzimas envolvidas na sua síntese, assim como, diminuindo o consumo de oxigênio pelas células afetadas (Messer et al., 2000).

Segundo Kasprzak (2002), a ruptura da fisiologia celular ocorre quando metais exógenos ligam-se às proteínas (incluindo DNA e proteínas nucleares) ou deslocam metais fisiológicos dos seus transportadores naturais, ocasionando danos estruturais e/ou funcionais nos ligantes. Alguns metais alteram o metabolismo do cálcio, ferro, cobre, bem como interferem nos mecanismos de reparo e replicação do DNA (Busselberg, 1995; Faccioni et al., 2003).

Na cromatina nuclear, a molécula de DNA, possuindo abundantes ânions de fosfato e grupos doadores de oxigênio, torna-se um sítio favorável para a ligação de cátions metálicos. Isto explicaria a presença de metais nos núcleos celulares quando culturas de células são expostas aos metais *in vitro*. As alterações da cromatina mais comumente observadas são as ligações cruzadas como, por exemplo, ligações entre duas citosinas ou entre duas timinas no mesmo filamento, que se manifestam em aberrações morfológicas cromossômicas (Kasprzak, 2002).

Os íons metálicos alteram as funções e a morfologia das células. Há uma correlação entre a localização do íon na célula e a citotoxicidade celular, bem como com as alterações estruturais provocadas nas células. Para alterar a função das enzimas mitocondriais e a respiração celular, os íons formam compostos moleculares, ligam-se à moléculas contendo nitrogênio e oxigênio. Os íons são encontrados no interior das células, se difundindo da membrana plasmática para o núcleo (Messer e Lucas, 2002).

Íons metálicos podem mediar respostas mutagênicas e carcinogênicas. Mutagenicidade é uma alteração na sequência de pares de bases do DNA, enquanto a carcinogenicidade resulta de inúmeras mutações no DNA que levam à célula a crescer e se dividir inapropriadamente. O papel dos metais no mecanismo de carcinogênese consiste na reação com vários compostos endógenos, tais como peróxido de hidrogênio, radicais sulfito e glutatona, produzindo espécies reativas, que causam alterações no DNA. O metal pode não atuar diretamente no DNA para causar as mutações, mas indiretamente ao gerar radicais livres. Os efeitos mutagênicos também podem ser explicados por alterações provocadas nos mecanismos de reparo do DNA, ainda não esclarecidas completamente (Hartwig, 2002).

Os íons de zinco (Zn^{+2}) formam complexos com proteínas e ácidos nucleicos, participam da transmissão e expressão da informação genética bem como da estruturação da cromatina e biomembranas (Tapiero e Tew, 2003). Segundo Kelleher e Lönnnerdal (2003), o

zinco é um elemento que interage com diferentes tipos de células, atuando na respiração celular, transporte de oxigênio, bem como na transcrição do DNA. Em concentrações excessivas, o metal pode ligar-se inapropriadamente à moléculas sensíveis formando radicais livres nocivos (Bury et al., 2003).

Alguns estudos demonstram que os íons metálicos penetram na membrana plasmática, ligam-se a enzimas celulares e modulam a expressão de citocinas sendo mediadores de respostas adversas locais e de respostas teciduais remotas (Catelas et al., 2003, 2005).

Partículas metálicas têm o potencial de produzir espécies reativas de oxigênio alterando o equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, o que pode provocar danos bioquímicos irreversíveis, como peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, oxidação de componentes principais do DNA, com consequentes danos teciduais. A oxidação de proteínas é francamente patogênica, provocando efeitos deletérios na função protéica. As proteínas ligadas a metais podem também promover oxidação de macromoléculas vizinhas (Petit et al., 2005).

Como descrito previamente, a biocompatibilidade dos metais depende da natureza química de cada um, da quantidade de metal liberada das estruturas protéticas e da duração de sua exposição aos tecidos. Os íons metálicos podem induzir a vários níveis de toxicidade em fibroblastos gengivais humanos. Diferentes tipos de células podem apresentar diversos tipos de toxicidade. Os metais são capazes de induzir à morte celular por necrose e apoptose, inibir a ação de várias enzimas, bem como diminuir a síntese de DNA e RNA (Issa et al., 2008)

As aplicações metálicas odontológicas podem estar relacionadas à alterações no DNA das células da mucosa bucal. O DNA é marcado por fragmentação dos cromossomos, com a formação de micronúcleos. Há um aumento na formação destes micronúcleos após o período de 30 dias de contato das células com o metal (Westphalen et al., 2008).

Os mecanismos através dos quais o zinco intracelular promove a morte celular continuam sendo pesquisados. Acredita-se que a inibição metabólica e a geração de espécies reativas de oxigênio sejam fundamentais para a toxicidade do zinco. As mitocôndrias são locais importantes para a ação tóxica do metal. A elucidação das ações patológicas de Zn^{+2} no cérebro é importante para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para tais condições (Weiss et al., 2000). Os metais pesados podem também acarretar a morte de células germinativas (Kaisman-Elbaz et al., 2009)

Os sais metálicos são formados na boca durante o processo de corrosão, por isso são utilizados nos estudos que avaliam a ação tóxica dos metais. É extremamente difícil prever o comportamento clínico de uma liga metálica, os testes *in vivo* são importantes para tal

avaliação. Elshahawy et al., (2009) demonstraram, em culturas de fibroblastos, que a menor porcentagem de células viáveis ocorreu na presença de zinco no meio de cultura, sendo considerado então, o mais tóxico dos íons, seguido do cobre e do níquel.

Baricević et al. (2010), relatam que o ambiente bucal é ideal para a degradação de metais, devido às suas propriedades enzimáticas, microbiológicas e térmicas. Os metais liberados podem causar efeitos tóxicos e mutagênicos. Estudo realizado por=esses autores avaliou a viabilidade celular e os efeitos dos íons metálicos no DNA de células da mucosa bucal, utilizando-se para tal, amostras de ligas de Co-Cr-Mo e Ni-Cr. Os resultados comprovaram alterações no DNA destas células, o que não foi constatado no grupo controle.

De acordo com a revisão da literatura, muitos estudos demonstram ações adversas do zinco sobre o organismo e os consequentes danos teciduais. Os achados do presente estudo, que constatarem alterações epiteliais provocadas pelo metal, corroboram, junto com os resultados descritos naquelas pesquisas, os efeitos prejudiciais do zinco. Outros estudos procuraram elucidar os mecanismos específicos de atuação do zinco capazes de provocar estas ações adversas. Ainda não existe um consenso a este respeito, mas a tendência atual predominante é atribuir esses efeitos à ação do zinco sobre a síntese e duplicação do DNA.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que o zinco, ingerido no leite materno durante a lactação, interfere no desenvolvimento normal do epitélio adamantino, epitélio juncional, gengiva inserida e ligamento periodontal do rato. As alterações observadas, mediante métodos morfométricos, associadas à desorganização tecidual, denotam a ação nociva do metal.

O presente estudo, apesar de não elucidar completamente todos os aspectos referentes ao papel desempenhado pelo zinco no desenvolvimento das estruturas bucais, abre perspectivas para a realização de futuros estudos que possam determinar os mecanismos específicos através dos quais se exerce a ação tóxica do metal.

REFERÊNCIAS

Alves ANL, Rosa HVD. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. *Rev Bras Ciênc Farm.* 2003;39:129-39.

Anusavice KJ. Philips, materiais dentários. 11ªed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. 764p.

Akira S, Kishimoto T. IL-6 and NF-IL6 in acute-phase response and viral infection. *Immunol Rev.* 1992;127:25-50.

Atkinson RW, Bremner SA, Anderson HR, Strchan DP, Bland JM. Short - term associations between emergency hospital admissions for respiratory and cardiovascular disease and outdoor air pollution in London. *Arch Environ Health.* 1999;54:398-411.

Baričević M, Ratkaj I, Mladinić M, Želježić D, Kraljević SP, Lončar B, Stipetić MM. In vivo assessment of DNA damage induced in oral mucosa cells by fixed and removable metal prosthodontic appliances. *Clin Oral Invest.* 2010;1.[Epub ahead of print].

Bhattacharyya MH, Whelton BD, Peterson DP. Gastrointestinal absorption of cadmium in mice during gestation and lactation. II. Continuous exposure studies. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1982;66(3):368-75.

Bhattacharyya MH, Sellers DA, Peterson DP. Postlactational changes in cadmium retention in mice orally exposed to cadmium during pregnancy and lactation. *Environ Res.* 1986; 40(1):145-54.

Biegho GH, Joyeux M, Hartemann P, Debry G. Determination of mineral contents in different kinds of milk and estimation of dietary intake in infants. *Food Addit Contam.* 1998;15(7):775-81.

Bonda PLF, Porrini R, Rizzio E, Pietra R, Fortaner S, Sabbioni E. Trace metals in oral mucosa in relation to the lichen ruberplanus pathology. A preliminary study carried out by neutron activation analysis. *J Trace Elem Med Biol.* 2001;15:79-83.

Bose S, Mukhopadhyay B, Chaudhury S, Battacharya S. Correlation of metal distribution, reduced glutathione and metallothionein levels in liver and kidney of rat. *Indian J Exp Biol.* 1994;32(9):679-81.

Boyne, R; Fell, B.F.; Robb, I. The surface area of the intestinal mucosa in the lactating rat. *J Physiol.* 1996;183(3):570-5.

Bremner I. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Methods Enzymol.* 1991;205:25-35.

Busselberg, D. Calcium channels as target sites of heavy metals. *Toxicol Lett.* 1995 Jul;82/83(2-6):255-61.

Campbell RM, Fell BF. Gastro-intestinal hypertrophy in the lactating rat and its relation to food intake. *J Physiol.* 1964;171(1):90-7.

Canli M, Furness RW. Toxicity of heavy metal dissolved in sea water and influences of sex and size on metal accumulation and tissue distribution in the Norway lobster *nephrops norvegicus*. *Mar Environ Res.* 1993;36:217-36.

Cantero BB. Estudio sobre el mecanismo de acción del zincum metalico. *Homeop Mex.* 1989;2:2-14.

Catelas I, Petit A, Vali H, Fragiskatos C, Meilleur R, Zukor DJ, Antoniou J, Huk OL. Quantitative analysis of macrophage apoptosis vs. necrosis induced by cobalt and chromium ions in vitro. *Biomaterials.* 2005;26(15):2441-53.

Catelas I, Petit A, Zukor DJ, Antoniou J, Huk OL. TNF- α secretion and macrophage mortality induced by cobalt and chromium ions in vitro-Qualitative analysis of apoptosis. *Biomaterials.* 2003;24(3):383-91.

Casey CE, Hambidge KM, Neville MC. Studies in human lactation: zinc, copper, manganese and chromium in human milk in the first lactation. *Am J Clin Nutr.* 1985;41(6):1193-200.

Celebić A, Baucić M, Stipetić J, Baucić I, Miko S, Momcilović B. Ion release from gold/platinum dental alloy: could release of other elements be accountable in the contact allergy attributed to the gold? *J Mat Sci Mat Med.* 2006;17(4):301-5.

Chalkley HW. Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst.* 1943;4:47-53.

Cherian MG, Howell SB, Imura N, Klaassen CD, Koropatrik J, Lazo JS, Waalkes MP. Role of metallothionein in carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1994;126(1):1-5.

Cousins RJ, McMahon MJ. Zinc and health current status and future directions. *J Nutr.* 2000; 130 Suppl 5:S1384-87.

Craig RG, Powers JM. Materiais dentários restauradores. 11ª ed. São Paulo: Livraria Editora Santos; 2004. 704p.

Daniels MJ, Dominici F, Samet JM, Zeger SL. Estimating particulate matter-mortality dose-response curves and threshold levels: an analysis of daily time-series for the 20 largest US cities. *Am J Epidemiol*. 2000;152(5):397-406.

Delèsse MA. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *Ann Min*. 1848;13:379-88.

Deng H, Bloomfield AV. Structural effects of cobalt-amine compounds on DNA condensation. *Biophys J*. 1999;77(3):1556-61.

Donangelo CM, Zapata CLV, Woodhouse LR, Shames DM, Mukherjee R, King JC. Zinc absorption and kinetics during pregnancy and lactation in Brazilian women. *Am J Clin Nutr*. 2005;82(1):118-24.

Duguid J, Bloomfield VA, Benevides J, Thomas GJ. Raman spectroscopy of DNA-Metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations. *Biophys J*. 1993;65:1916-28.

Elshahawy WM, Watanabe I, Kramer P. *In vitro* cytotoxicity evaluation of elemental ions released from different prosthodontic materials. *Dent Mat*. 2009;25(12):1551-5.

Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME. In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2003;124(6):687-693.

Feliciani C, Gupta AK, Sauder DN. Keratinocytes and cytokine/growth factors. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1996;7:300-18.

Ferreira ME, De Lourdes Pereira M, Garcia e Costa F, Sousa JP, De Carvalho GS. Comparative study of metallic biomaterials toxicity: a histochemical and immunohistochemical demonstration in mouse spleen. *J Trace Elem Med Biol*. 2003;17:45-9.

Fung EB, Ritchie LD, Woodhouse LR, Roehi R, King JC. Zinc absorption in women during pregnancy and lactation: a longitudinal study. *Am J Clin Nutr*. 1997;66(1):80-8.

Gao YG, Sriram M, Wang AHJ. Crystallographic studies of metal-ion - DNA interactions: different binding modes of cobalt (II), copper (II) and barium (II) to N⁷ of guanines in Z-DNA and a drug-DNA complex. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(17):4093-101.

Garhammer P, Hiller KA, Reitingner T, Schmalz G. Metal content of saliva of patients with and without metal restorations. *Clin Oral Investig*. 2004;8(4):238-42.

Gerlach RF, Souza AP, Cury JA, Line SRP. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases *in vitro*. Eur J Oral Sci. 2000;108(4):327-34.

Gilmour PS, Nyska A, Schladweiler MC, Mc Gee JK, Wallenborn JG, Richards JH, Kodovanti UP. Cardiovascular and blood coagulative effects of pulmonary zinc exposure. Toxicol Appl Pharmacol. 2006;211(1):41-52.

Gomes, P.O.; Watanabe, I; Matera, A.; Lopes, R.A.; Goldenberg, A. Effects of CO₂ laser on the pancreas of dogs: study at light and scanning electron microscopy. Acta Cirur Bras. 1990;5:59-65.

Hambidge KM, Abebe Y, Gibson RS, Westcott JE, Miller LV, Stoecker SLBJ, Arbide I, Teshome A, Bailey KB, Krebs NF. Zinc absorption during late pregnancy in rural southern Ethiopia. Am J Clin Nutr. 2006;84(5):1102-6.

Hanks CT, Wataha JC, Sun ZL. In vitro models of biocompatibility: a review. Dent Mat. 1996;12(3):186-93.

Hartwig A, Schwerdtle T. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. Toxicol Lett. 2002;127(1-3):47-54.

Hennig A. Fehler der Oberflächenbestimmung von Kernen bei endlicher Schnittdick. Mikroskopie. 1957;12:7-11.

Hensten-Pettersen A. Casting alloys: side effects. Adv Dent Res. 1992;6:38-43.

Hildebrand HF, Veron C, Martin P. Les alliages dentaires en métaux non précieux et l'allergie. J Biol Bucc. 1989;17:227-43.

House K, Sernetz F, Dymock D, Sandy JR, Ireland AJ. Corrosion of orthodontic appliances--should we care? Am J Orth Dentofacial Orthop. 2008;133(4):584-92.

Issa Y, Brunton P, Waters CM, Watts, DC. Cytotoxicity of metal ions to human oligodendroglial cells and human gingival fibroblasts assessed by mitochondrial dehydrogenase activity. Dent Mat. 2008;24(2):281-7

Iszard MB, Liu J, Klaassen CD. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defence mechanism in rats. Toxicol. 1995;104(1-3):25-33.

Ito A, Ojima K, Naito H, Ichinose N, Tateishi T. Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res*. 2000; 50(2):178-83.

Kaisman-Elbaz T, Sekler I, Fishman D, Karol N, Forberg M, Kahn N, Hershfinkel M, Silverman W. Cell death induced by zinc and cadmium is mediated by clusterin in cultured mouse seminiferous tubules. *J Cell Physiol*. 2009;220(1):222-9.

Kamagata Y, Miyasaka N, Inoue H, Hashimoto J, Lida M. Cytokine production in inflamed human gingival tissues-interleukin-6. *Nippon Shishubyo Gakkai Kaishi*. 1989;31(4):1081-7.

Kasprzak SK. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2002;32(10):958-67.

Kelleher SL, Lonnerdal B. Zn transporter levels and localization change throughout lactation in rat mammary gland and are regulated by Zn in mammary cells. *J Nutr*. 2003;133(11):3378-85.

Khosravi HM, Jalali BA, Eftekhari MH. Effects of dietary zinc supplement during lactation on longitudinal changes in plasma and milk zinc concentrations. *Pak J Biol Sci*. 2007; 10(8):71-5.

King JC. Determinants of maternal zinc status during pregnancy. *Am J Clin Nutr*. 2000;71 Suppl 5:S1334-43.

Klassen CD. Cassarett and Doull's Toxicology. 5th ed. New YorkMc: Graw-Hill; 1996.

Kocadereli I, Atac PA, Kale PS, Ozer D. Salivary nickel and chromium in patients with fixed orthodontic appliances. *Angle Orthod*. 2000;70(6):431-4.

Kodavanti UP, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Hauser R, Christiani DC, Samet JM, Gee J, Richards JH, Costa DL. Pulmonary and systemic effects of zinc - containing emission particles in three rat strains: multiple exposure scenarios. *Toxicol Sci*. 2002;70(1):73-85.

Lassila LV, Vallittu, PK. Effect of water and artificial saliva on the low cycle fatigue resistance of cobalt-chromium dental alloy. *J Prosthet Dent*. 1998;80(6):708-13.

Lucis OJ, Lucis R, Shaikh ZA. Cadmium and zinc in pregnancy and lactation. *Arch Environ Health*. 1972;25(1):14-22.

Manaranche C, Hornberger, H. Corrosion and biocompatibility of dental alloys. *Europ Cells Mat.* 2005;9 Suppl 1:S35-6.

Maret W, Krezel A. Cellular zinc and redox buffering capacity of metallothionein/thionein in health and disease. *Mol Med.* 2007;13(7-8):371-5.

Masada MP, Persson R, Kenney JS, Lee SW, Page RC, Allison AC. Measurement of interleukin-1 beta in gingival crevicular fluid: implications for pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1990;25(3):156-63.

Messer RLW, Bishop S, Luca LC. Effects of metallic ion toxicity on human gingival fibroblasts morphology. *Biomaterials.* 1999;20(18):1647-57.

Messer RLW, Lucas LC. Localization of metallic ions within gingival fibroblast subcellular fractions. *J Biomed Mater Res.* 2002;59(3):466-72.

Merz WA. Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen in Mikroskop und ihre anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-volumen-relationen in Knochenewebe. *Mikroskopie, Wien,* 1968;22(5):132-42.

Mockers O, Deroze D, Camps J. Cytotoxicity of orthodontic bands, brackets and archwires in vitro. *Dent Mat.* 2002;18(4):311-7.

Morse A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone for sectioning in paraffin. *J Dent Res.* 1945;24(3-4):143-53.

Nelson KS, Wataha JC, Lockwood PE. Accelerated toxicity testing of casting alloys and reduction of intraoral release of elements. *J Prosthet Dent.* 1999;81(6):715-720.

O'brien CE, Krebs BS, Westcott JL, Dong F. Relationships among plasma zinc, plasma prolactin, milk transfer, and milk zinc in lactating women. *J Hum Lac.* 2007;23(2):179-83.

Parr RM, Taylor DM. The concentrations of cobalt, copper, iron and zinc in some normal human tissues as determined by neutron-activation analysis. *Biochem J.* 1964;91(3):424-31.

Petit A, Mwale F, Tkaczyk C, Antoniou J, Zukor DJ, Huk OL. Cobalt and chromium ions induce nitration of proteins in human U937 macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 2006;79(3):599-605.

Petit A, Mwale F, Tkaczyk C, Antoniou J, Zukor DJ, Huk, OL. Induction of protein oxidation by cobalt and chromium ions in human U937 macrophages. *Biomaterials*. 2005;26(21):4416-22.

Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurton GD. Lung cancer cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*. 2002;287(9):1132-41.

Post JI, Eibl JK, Ross GM. Zinc induces motor neuron death via a selective inhibition of brain-derived neurotrophic factor activity. *Amyotroph Lat Scler*. 2008;9(3):149-55.

Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr*. 2000;130 Suppl 5:S1447-54.

Rainbow PS. Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans. *Est Coast Shelf Sci*. 1997;44:169-75.

Rinić N, Baucić I, Miko S, Papić M, Prohić E. Corrosion behaviour of the Co-Cr-Mo dental alloy in solutions of different composition and different pH values. *Coll Antropol*. 2003;27 Suppl 2:S99-106.

Rossipal E, Krachler M, Micet-Turk D. Investigation of the transport of trace elements across barriers in humans: studies of placental and mammary transfer. *Acta Paediatr*. 2000;89(10):1190-5.

Rossipal, E; Krachler, M. Pattern of trace elements in human milk during the course of lactation. *Nut Res*. 1998;18(1):11-24.

Sala MA, Komesu MC, Lopes RA, Maia Campos, G. Karyometric study of basal cell carcinoma. *Braz Dent J*. 1994;5(1):11-4.

Sala MA, Lopes RA, Matheus M. Método morfológico para análisis cuantitativa de los tejidos. Determinación de los parâmetros normalis para el hepatocito de rata. *Arch Fac Med Zaragoza*. 1992;32(1):29-31.

Salgueiro MJ. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr Res*. 2000;20(5):737-55.

Sandstead HH. Understanding zinc: recent observations and interpretations. *J Lab Clin Med*. 1994;124(3):322-7.

Schedle A, Samorapoompichit P, Rausch-Fan XH, Franz A, Fureder W, Sperr WR, Sperr W, Ellingerl A, Slavicek R, Boltz-Nitulescu G, Valent P. Response of L-929 fibroblasts human

gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations. *J Dent Res.* 1995; 74(8):1513-20.

Schmalz G, Arenholt-Bindslev D, HilleR KA, Schweikl HE. Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry. *Eur J Oral Sci.* 1997;105(1):86-91.

Schmalz G, Garhammer P. Biological interactions of dental cast alloys with oral tissues. *Dent Mat.* 2002;18(5):396-406.

Schmalz G. Modern concepts in biocompatibility testing of restorative materials. *Trans Acad Dent Mat.* 1996;9:170-5.

Schmalz G, Schuster H, Schweikl HE. Influence of metals on IL-6 release in vitro. *Biomaterials.* 1998;19(18):1689-14.

Schmalz G, Schweikl H, Hiller KA. Release of prostaglandin E₂, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials. *Eur J Oral Sci.* 2000;108(5):442-8.

Shimpo H. Effect of arm design and chemical polishing on retentive force of cast titanium alloy clasps. *J Prosthodont.* 2008;17(4):300-7.

Souza AP, Gerlach RF, Line SRP. Inhibition of human gelatinases by metals released from dental amalgam. *Biomaterials.* 2001;22(14):2025-30.

Stanford J.W. Recommendations for determining biocompatibility and safety clinical use of metals in dentistry. *Int Dent J.* 1986;36(1):45-8.

Suzuki N. Metal allergy in dentistry: detection of allergen metals with X-ray fluorescence spectroscopy and its application toward allergen elimination. *Int J Prosthodont.* 1995; 8(4):351-69.

Szokmáry E, Ungvary G, Hudak A, Tatrai E, Naray M, Morvai V. Effects of cobalt sulfate on prenatal development of mice, rats, and rabbits, and on early postnatal development of rats. *J Toxicol Environ Health Part A.* 2001;62(5):367-86.

Szckurek EI, Bjornsson CS, Taylor CG. Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats. *The J Nutr.* 2001;131(8):2132-38.

Takahashi K, Takashiba S, Nagai A, Takigawa M, Myoukai F, Kurihara H, Murayama Y. Assessment of interleukin-6 in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*. 1994; 65(2):147-53.

Takano Y, Taguchi T, Suzuki I, Balis JU, Yuri K. Cytotoxicity of Heavy Metals on Primary Cultured Alveolar Type II Cells. *Environ Res*. 2002;89(2):138-45.

Takatsuka T, Hirano J, Matsumoto H, Honma T. X-ray absorption fine structure analysis of the local environment of zinc in dentine treated with zinc compounds. *Eur J Oral Sci*. 2005; 113(2):180-3.

Tandon SK, Singh S, Prasad S, Mathur N. Hepatic and renal metallothionein induction by an oral equimolar dose of zinc, cadmium or mercury in mice. *Food Chem Toxicol*. 2001; 39(6):571-7.

Tang T, Chappell HF, Dove MT, Reeder RJ, Lee YJ. Zinc incorporation into hydroxylapatite. *Biomaterials*. 2009;30(15):2864-72

Tapiero H, Tew K.D. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother*. 2003;57(9):399-411.

Tennant RW, Margolin BH, Shelby MD, Zeigler E, Haseman JK, Spalding J, Caspary W, Tomkeieff S.I. Linear intercepts area and volume. [letter]. *Nature*. 1945;155:3923.

Valle BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*. 1993; 73(1):79-118.

Xu L, Yu G, Zhang E, Pan F, Yang K. In vivo corrosion behavior of Mg-Mn-Zn alloy for bone implant application. *J Biomed Mat Res Part A*. 2007;83(3):703-11.

Wallenborn JG, Evansky P, Shannahan JH, Vallanat B, Ledbetter MCS, Richards JH, Gottipolu RR, Nyska A, Kodovanti U.P. Subchronic inhalation of zinc sulfate induce cardiac changes in healthy rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;232(1): 69-77

Wappelhorst O, Kühn I, Heidenreich H, Markert B. Transfer of selected elements from food into human milk. *Nutrition*. 2002;18(4):316-22.

Wataha, JC. Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *J Prosthet Dent*. 2000; 83(2):223-34.

Wataha JC, Lockwood PE. Release of elements from dental casting alloys into cell-culture medium over 10 months. *Dent Mat.* 1998 Mar;14(2):158-163.

Wataha JC, Messer RL. Casting alloys. *Dent Clin North Am.* 2004;48(2):499-512.

Wataha J.C, Ylardm CT, Sun Z. Effect of cell line on *in vitro* metal ion cytotoxicity. *Dent Mater.* 1994;10(3):156-161.

Watson GE, Davis BA, Raubertas RF, Pearson SK, Bowen WH. Influence of maternal lead ingestion on caries in rat pulps. *Nat Med.* 1997;3(9):1024-5.

Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol.* 1969;26:235-302.

Weiss JH, Sensi SL, Koh J.Y. Zn^{2+} : a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(10):395-401.

Westphalen GH, Menezes LM, Prá D, Garcia GG, Schmitt VM, Henriques JAP, Medina-Silva, R. *In vivo* determination of genotoxicity induced by metals from orthodontic appliances using micronucleus and comet assays. *Genet Mol Res.* 2008;7:1259-66.

Yoshida T, Numazawa S, Kuroiwa Y. Induction of hepatic and renal ornithine decarboxylase by cobalt and other metal ions in rats. *Biochem J.* 1986;233(2):577-81.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Tabela complementar dos resultados obtidos do peso corporal

Tabela 1 - Médias dos pesos corporais (em gramas) dos filhotes controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

C	T
62,00	47,00
58,00	36,00
64,00	44,00
56,00	45,00
60,00	43,00
$\overline{X}$	$\overline{X}$
60,00	43,00

Ucal= 0*

p|U|= 0,004

(*) Estatisticamente significativa para $p < 0,01$

APÊNDICE B - Tabelas complementares dos resultados cariométricos

Tabela 1 - Valores cariométricos dos núcleos das células do epitélio adamantino do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann- Whitney.

Diâmetro maior (µm)		Diâmetro menor (µm)		Diâmetro médio (µm)		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
8.48	6.40	6.32	3.92	7.32	5.00	1.35	1.66
6.80	5.36	5.56	3.52	6.14	4.34	1.23	1.55
6.88	5.48	5.28	4.76	6.02	5.10	1.32	1.16
8.60	5.44	5.60	4.28	6.93	4.82	1.55	1.30
8.64	5.56	6.60	4.72	7.55	5.12	1.33	1.20
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
7.88	5.64	5.87	4.24	6.79	4.87	1.35	1.37
Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 10,5 ^{ns}	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,383	

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01

(^{ns}) Não significativa

Tabela 2 - Valores cariométricos dos núcleos das células do epitélio adamantino do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Perímetro (µm)		Área (µm²)		Volume (µm³)		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
23.39	16.47	42.32	19.73	209.61	66.65	4.87	3.33
19.50	14.12	29.66	14.86	122.45	43.69	4.09	2.89
19.21	16.12	28.49	20.80	115.32	73.42	4.01	3.40
22.58	15.35	37.89	18.35	177.06	60.19	4.62	3.20
24.10	16.21	45.27	20.64	235.94	71.50	5.01	3.40
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
21.75	15.65	36.72	23.00	172.07	63.09	4.52	3.24
Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004	

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01

Tabela 3 - Valores cariométricos dos núcleos das células do epitélio adamantino do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de Forma		Índice de Contorno	
C	T	C	T	C	T
0.65	0.78	0.96	0.91	3.61	3.72
0.48	0.72	0.98	0.93	3.59	3.68
0.56	0.34	0.97	0.99	3.61	3.57
0.74	0.50	0.93	0.97	3.68	3.61
0.58	0.35	0.96	0.98	3.62	3.58
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
0.60	0.53	0.96	0.95	3.62	3.63
Ucal= 10 ^{ns}		Ucal= 11,5 ^{ns}		Ucal= 11,5 ^{ns}	
p U = 0,345		p U = 0,460		p U = 0,460	

(^{ns}) Não significativa

Tabela 4 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada basal do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Diâmetro maior (µm)		Diâmetro menor (µm)		Diâmetro médio (µm)		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
8.00	6.76	6.12	5.28	6.99	5.97	1.33	1.31
7.80	6.36	6.12	4.00	6.90	5.04	1.29	1.64
8.00	5.64	6.40	4.36	7.15	4.95	1.25	1.33
8.76	6.04	5.92	4.56	7.20	5.24	1.51	1.35
8.16	6.04	6.04	4.64	7.02	5.29	1.36	1.33
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
8.14	6.16	6.12	4.56	7.05	5.29	1.34	1.39
Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 10 ^{ns}	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,345	

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01

(^{ns}) Não significativa**Tabela 5** - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada basal do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Perímetro (µm)		Área (µm²)		Volume (µm³)		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
22.31	19.03	38.80	28.15	185.72	114.73	4.65	3.96
21.98	16.53	37.70	20.01	177.18	68.65	4.59	3.34
22.71	15.82	40.46	19.32	196.31	64.96	4.76	3.29
23.32	16.78	40.72	21.58	197.88	76.52	4.78	3.48
22.44	16.89	39.02	21.93	186.08	78.07	4.68	3.51
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
22.55	17.01	39.34	22.19	188.63	80.58	4.69	3.51
Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004	

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01

Tabela 6 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada basal do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de Forma		Índice de Contorno	
C	T	C	T	C	T
0.59	0.51	0.97	0.96	3.61	3.61
0.55	0.75	0.97	0.91	3.60	3.72
0.55	0.54	0.98	0.96	3.59	3.62
0.68	0.54	0.93	0.96	3.67	3.63
0.66	0.51	0.96	0.96	3.61	3.62
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
0.60	0.57	0.96	0.95	3.61	3.64
Ucal= 5 ^{ns}		Ucal= 6 ^{ns}		Ucal= 5 ^{ns}	
p U = 0,075		p U = 0,111		p U = 0,075	

(^{ns}) Não significativa

Tabela 7 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Diâmetro maior (µm)		Diâmetro menor (µm)		Diâmetro médio (µm)		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
8.04	6.60	6.04	4.40	6.96	5.38	1.34	1.49
8.12	5.76	5.80	4.28	6.86	4.96	1.45	1.40
8.84	6.32	6.00	4.96	7.28	5.59	1.51	1.49
8.52	7.04	5.76	4.28	7.00	5.48	1.50	1.67
8.36	6.92	6.16	4.96	7.17	5.85	1.38	1.43
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
8.37	6.52	5.95	4.57	7.05	5.45	1.43	1.49
Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 10 ^{ns}	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,345	

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01

(^{ns}) Não significativa

Tabela 8 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Perímetro (µm)		Área (µm²)		Volume (µm³)		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
22.26	17.66	38.48	23.44	183.71	86.55	4.63	3.62
22.08	15.71	36.98	19.10	172.01	64.74	4.55	3.25
23.58	17.03	42.03	21.71	210.58	76.81	4.83	3.49
22.68	18.09	38.61	23.78	182.69	89.10	4.65	3.64
22.98	18.83	40.72	26.95	199.50	106.54	4.77	3.89
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
33.71	17.46	39.36	22.99	189.69	84.74	4.68	3.57
Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004	

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01

Tabela 9 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann- Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de Forma		Índice de Contorno	
C	T	C	T	C	T
0.59	0.68	0.96	0.94	3.62	3.66
0.65	0.62	0.94	0.95	3.66	3.63
0.67	0.67	0.93	0.94	3.67	3.67
0.71	0.77	0.94	0.90	3.67	3.74
0.61	0.66	0.96	0.95	3.63	3.64
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
0.64	0.68	0.94	0.93	3.65	3.66
Ucal= 7,5 ^{ns}		Ucal= 10 ^{ns}		Ucal=10 ^{ns}	
p U = 0,182		p U = 0,345		p U = 0,345	

(^{ns}) Não significativa

Tabela 10 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada basal do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Diâmetro maior (µm)		Diâmetro menor (µm)		Diâmetro médio (µm)		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
8.36	8.52	6.56	5.92	7.40	7.10	1.29	1.46
9.52	6.68	5.60	5.36	7.30	5.98	1.73	1.27
9.04	7.20	6.76	5.16	7.81	6.09	1.35	1.42
9.12	7.12	5.68	5.16	7.19	6.06	1.63	1.40
8.16	7.08	6.76	5.24	7.42	6.09	1.22	1.38
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
8,84	7,32	6,27	5,36	7,42	6,26	1,44	1,38
Ucal= 2 **		Ucal= 2**		Ucal= 0*		Ucal= 12 ^{ns}	
p U = 0,016		p U = 0,016		p U = 0,004		p U = 0,500	

(**) Estatisticamente significativa para p< 0,05

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01

(^{ns}) Não significativa

Tabela 11 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada basal do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Perímetro (µm)		Área (µm²)		Volume (µm³)		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
23.55	22.92	43.32	39.55	218.00	189.44	4.93	4.71
24.20	19.00	41.94	28.46	207.29	117.43	4.85	3.98
24.97	19.59	48.35	29.19	257.21	120.21	5.20	4.04
23.60	19.45	40.84	28.75	199.45	116.53	4.78	4.03
23.53	19.49	43.45	29.22	218.46	120.44	4.93	4.05
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
23,97	20,09	43,58	31,03	220,08	132,81	4,93	4,16
Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004	

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01

Tabela 12 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada basal do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de Forma		Índice de Contorno	
C	T	C	T	C	T
0.56	0.65	0.97	0.94	3.60	3.66
0.79	0.49	0.89	0.97	3.76	3.60
0.63	0.61	0.96	0.95	3.61	3.65
0.76	0.62	0.91	0.95	3.71	3.63
0.45	0.62	0.98	0.96	3.59	3.63
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
0,63	0,37	0,94	0,95	3,65	3,63
Ucal= 10 ^{ns}		Ucal= 12 ^{ns}		Ucal= 11,5 ^{ns}	
p U = 0,345		p U = 0,500		p U = 0,460	

(^{ns}) Não significativa

Tabela 13 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney.

Diâmetro maior (µm)		Diâmetro menor (µm)		Diâmetro médio (µm)		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
9.16	7.48	7.16	5.88	8.09	6.63	1.29	1.29
9.56	6.20	6.84	5.20	8.08	5.67	1.44	1.21
9.16	6.20	6.92	5.20	7.96	5.67	1.34	1.21
8.36	6.44	6.08	4.48	7.12	5.37	1.39	1.36
8.92	6.72	7.12	5.44	7.96	6.04	1.26	1.25
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
9,03	6,60	6,83	5,24	7,84	5,87	1,34	1,26
Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 4,5 ^{ns}	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,061	

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01
(^{ns}) Não significativa

Tabela 14 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney.

Perímetro (µm)		Área (µm²)		Volume (µm³)		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
25.78	21.10	51.87	34.68	286.11	156.06	5.38	4.41
26.00	17.96	51.62	25.57	285.59	99.31	5.37	3.78
25.42	17.76	50.01	25.57	270.67	99.31	5.29	3.78
22.89	17.84	39.84	24.85	191.78	96.41	4.73	3.71
25.31	19.18	50.36	28.78	274.46	117.39	5.30	4.02
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
25,08	18,76	48,74	27,89	168,47	113,69	5,21	3,94
Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 1*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,008	

(*) Estatisticamente significante para $p < 0,01$

Tabela 15 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de Forma		Índice de Contorno	
C	T	C	T	C	T
0.53	0.53	0.97	0.97	3.60	3.60
0.64	0.45	0.95	0.98	3.65	3.58
0.59	0.45	0.96	0.98	3.62	3.58
0.59	0.57	0.95	0.96	3.64	3.63
0.53	0.50	0.97	0.98	3.59	3.59
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
0,57	0,50	0,96	0,97	3,62	3,59
Ucal= 3*		Ucal= 12,5 ^{ns}		Ucal= 5 ^{ns}	
p U = 0,028		p U = 0,539		p U = 0,075	

(*) Estatisticamente significante para $p < 0,05$

(^{ns}) Não significante

Tabela 16 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada granulosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Diâmetro maior (µm)		Diâmetro menor (µm)		Diâmetro médio (µm)		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
8.64	6.84	6.12	4.64	7.27	5.63	1.44	1.51
8.72	6.76	5.76	5.36	7.08	6.01	1.53	1.29
8.64	6.48	6.24	4.76	7.34	5.55	1.43	1.40
7.24	6.44	5.36	4.72	6.22	5.51	1.37	1.40
8.00	8.44	6.64	4.84	7.28	6.39	1.22	1.77
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
8,24	6,99	6,02	4,86	7,03	5,76	1,39	1,75
Ucal= 2**		Ucal= 0,5*		Ucal= 1*		Ucal= 11 ^{ns}	
p U = 0,016		p U = 0,006		p U = 0,008		p U = 0,421	

(**) Estatisticamente significativa para $p < 0,05$

(*) Estatisticamente significativa para $p < 0,01$

(^{ns}) Não significativa

Tabela 17 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada granulosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Perímetro (µm)		Área (µm²)		Volume (µm³)		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
23.40	18.24	42.44	25.01	217.16	95.68	4.83	3.74
23.05	19.13	39.65	28.84	192.40	120.11	4.70	4.00
23.58	17.81	42.98	24.47	219.83	94.09	4.87	3.68
19.96	17.68	30.38	24.13	127.78	92.08	4.13	3.66
23.07	21.29	42.16	32.26	210.70	140.71	4.85	4.24
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
22,61	18,83	39,52	26,94	194,57	108,53	4,67	3,86
Ucal= 1*		Ucal= 1*		Ucal= 1*		Ucal= 1*	
p U = 0,008		p U = 0,008		p U = 0,008		p U = 0,008	

(*) Estatisticamente significativa para $p < 0,01$

Tabela 18 - Valores cariométricos médios dos núcleos das células da camada granulosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann - Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de forma		Índice de Contorno	
C	T	C	T	C	T
0.65	0.71	0.95	0.93	3.65	3.67
0.69	0.55	0.93	0.97	3.68	3.60
0.62	0.58	0.95	0.95	3.65	3.64
0.57	0.58	0.96	0.95	3.63	3.64
0.47	0.80	0.98	0.89	3.58	3.77
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
0,60	0,64	0,95	0,93	3,63	3,66
Ucal= 10 ^{ns}		Ucal= 8,5 ^{ns}		Ucal= 7 ^{ns}	
p U = 0,345		p U = 0,242		p U = 0,155	

(^{ns}) Não significativa

Tabela 19 - Valores cariométricos médios dos núcleos das fibras do ligamento periodontal do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann- Whitney.

Diâmetro maior (µm)		Diâmetro menor (µm)		Diâmetro médio (µm)		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
7.32	6.16	5.16	4.60	6.14	5.32	1.45	1.38
7.96	4.88	4.44	3.28	5.94	4.00	1.83	1.53
7.40	6.68	4.96	4.68	6.05	5.59	1.54	1.44
6.68	7.08	4.52	4.20	5.49	5.45	1.50	1.74
7.56	6.16	4.44	4.04	5.79	4.98	1.76	1.58
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
7,38	6,19	4,70	4,16	5,82	5,06	1,61	1,53
Ucal= 1,5*		Ucal= 6 ^{ns}		Ucal= 1*		Ucal= 8 ^{ns}	
p U = 0,012		p U = 0,111		p U = 0,008		p U = 0,210	

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01

(^{ns}) Não significativa

Tabela 20 - Valores cariométricos médios dos núcleos das fibras do ligamento periodontal do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney.

Perímetro (μm)		Área (μm²)		Volume (μm³)		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
19.78	17.03	29.81	22.53	124.58	82.87	4.08	3.53
19.93	12.96	27.77	12.88	11.91	36.37	3.94	2.66
19.65	18.02	29.00	24.69	120.27	94.17	4.02	3.71
17.78	18.07	23.78	23.28	88.49	85.87	3.65	3.61
19.23	16.25	26.70	19.48	107.62	65.56	3.84	3.30
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
19,27	16,46	27,41	20,57	90,57	72,96	3,90	3,36
Ucal= 2**		Ucal= 1*		Ucal= 6 ^{ns}		Ucal= 1*	
p U = 0,016		p U = 0,008		p U = 0,111		p U = 0,008	

(*) Estatisticamente significativa para $p < 0,01$

(**) Estatisticamente significativa para $p < 0,05$

(^{ns}) Não significativa

Tabela 21 - Valores cariométricos médios dos núcleos das fibras do ligamento periodontal do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados com zinco (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de Forma		Índice de Contorno	
C	T	C	T	C	T
0.67	0.59	0.95	0.95	3.65	3.63
0.81	0.71	0.87	0.93	3.80	3.68
0.70	0.67	0.93	0.95	3.68	3.65
0.71	0.77	0.94	0.89	3.67	3.77
0.78	0.72	0.89	0.92	3.78	3.70
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
0,73	0,69	0,91	0,92	3,71	3,68
Ucal= 9 ^{ns}		Ucal= 10 ^{ns}		Ucal= 9 ^{ns}	
p U = 0,274		p U = 0,345		p U = 0,274	

(^{ns}) Não significativa

APÊNDICE C - Tabelas complementares dos resultados estereológicos

Tabela 1 - Valores médios dos volumes citoplasmático e volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular do epitélio adamantino do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney.

Volume Citoplasmático (μm^3)		Volume Celular (μm^3)		Relação N/C		Espessura (μm)		Densidade Numérica Celular ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	
C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
99,77	112,20	279,37	177,65	0,38	0,14	6,63	8,76	3,60	5,60
100,53	19,15	213,63	52,66	0,26	0,25	8,04	5,35	4,70	19,0
56,55	81,81	169,65	147,26	0,36	0,19	5,42	7,09	5,90	6,80
96,94	33,51	210,04	67,02	0,28	0,17	11,15	4,32	4,80	14,9
89,80	65,45	269,39	130,90	0,40	0,21	5,55	8,30	3,70	7,60
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
88,71	75,51	228,41	115,09	0,33	0,19	7,35	6,76	4,54	10,78
Ucal= 7 ^{ns}		Ucal= 1*		Ucal= 0*		Ucal=11 ^{ns}		Ucal=1*	
p U = 0,155		p U = 0,008		p U = 0,004		p U = 0,421		p U = 0,008	

(*) Estatisticamente significante para $p < 0,01$

(^{ns}) Não significante

Tabela 2 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular das células da camada basal do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney.

Volume Citoplasmático (μm^3)		Volume Celular (μm^3)		Relação N/C		Espessura (μm)		Densidade Numérica Celular ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	
C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
100,53	53,55	213,63	119,00	0,26	0,25	7,48	4,91	4,70	8,40
133,66	43,63	246,76	109,08	0,21	0,26	9,85	5,26	4,10	9,20
179,59	30,16	359,19	63,67	0,28	0,19	13,55	7,33	2,80	15,70
157,15	71,99	336,74	137,44	0,29	0,20	13,82	9,44	3,00	7,30
107,76	74,80	287,35	140,25	0,36	0,20	11,78	7,45	3,50	7,10
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
135,73	54,82	288,73	113,88	0,35	0,22	11,29	6,87	3,60	9,50
Ucal= 0*		Ucal= 0*		Ucal= 2,5**		Ucal= 1*		Ucal=0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,022		p U = 0,008		p U = 0,004	

(*) Estatisticamente significante para $p < 0,01$

(**) Estatisticamente significante para $p < 0,05$

Tabela 3 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular das células da camada espinhosa do epitélio juncional do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann- Whitney.

Volume Citoplasmático (μm^3)		Volume Celular (μm^3)		Relação N/C		Espessura (μm)		Densidade Numérica Celular ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	
C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
178,35	99,48	291,44	164,93	0,19	0,16	28,67	22,81	3,40	6,10
144,76	46,54	257,86	80,05	0,21	0,14	26,84	16,88	3,90	12,5
291,84	98,17	471,44	163,62	0,20	0,16	26,36	11,79	2,10	6,10
219,50	112,20	399,10	177,65	0,25	0,14	19,84	15,92	2,50	5,60
345,89	81,81	525,48	147,26	0,17	0,19	36,27	12,34	1,90	6,80
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
210,85	87,64	389,06	146,70	0,20	0,15	27,59	15,94	2,76	7,42
Ucal=0*		Ucal= 0*		Ucal= 1,5*		Ucal= 1 *		Ucal=0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,012		p U = 0,008		p U =0,004	

(*) Estatisticamente significativa para $p < 0,01$

Tabela 4 - Valores médios da densidade de superfície, da espessura total do epitélio, da relação superfície externa/camada basal e da densidade numérica celular do epitélio juncional total do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann- Whitney.

Densidade de Superfície (mm^2/mm^3)		Espessura Total do Epitélio (μm)		Relação Superfície externa /Camada basal		Densidade Numérica Celular ($\text{Nx}10^6/\text{mm}^3$)	
C	T	C	T	C	T	C	T
2,47	2,38	36,77	23,32	1,04	0,45	3,70	6,60
2,21	2,92	34,65	26,01	0,76	0,75	3,90	13,9
2,62	4,42	31,64	19,64	0,88	0,95	2,30	6,90
2,74	3,35	26,56	28,49	0,69	1,16	2,60	6,20
2,08	2,57	40,63	21,80	0,91	0,46	2,20	6,90
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
2,42	3,12	34,05	28,21	0,85	0,75	2,94	8,10
Ucal= 5 ^{ns}		Ucal= 1*		Ucal= 10 ^{ns}		Ucal=0*	
p U = 0,075		p U =0,008		p U = 0,345		p U = 0,004	

(*) Estatisticamente significativa para $p < 0,01$

(^{ns}) Não significativa

Tabela 5 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular das células da camada basal do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann- Whitney.

Volume Citoplasmático (µm³)		Volume Celular (µm³)		Relação N/C		Espessura (µm)		Densidade Numérica Celular (Nx10 ⁶ /mm³)	
C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
146,94	282,22	326,54	461,81	0,31	0,20	8,40	7,73	3,10	2,20
179,59	58,18	359,19	123,63	0,28	0,23	10,93	6,70	2,80	8,10
52,82	102,82	232,42	215,91	0,51	0,26	9,23	8,10	4,30	4,60
122,88	99,79	302,47	212,89	0,35	0,26	14,03	9,01	3,30	4,70
110,52	1328,30	290,11	1495,40	0,36	0,03	9,44	5,13	3,50	0,70
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
122,55	385,06	302,14	501,92	0,36	0,19	10,40	7,33	3,40	4,06
Ucal= 12 ^{ns}		Ucal= 10 ^{ns}		Ucal= 0*		Ucal=1*		Ucal=10 ^{ns}	
p U = 0,500		p U = 0,345		p U = 0,004		p U = 0,008		p U = 0,345	

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01

(^{ns}) Não significativa

Tabela 6 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular das células da camada espinhosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann- Whitney.

Volume Citoplasmático (µm³)		Volume Celular (µm³)		Relação N/C		Espessura (µm)		Densidade Numérica Celular (Nx10 ⁶ /mm³)	
C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
402,12	191,10	670,21	304,19	0,23	0,17	47,05	34,96	1,50	3,30
386,54	133,75	654,62	199,20	0,23	0,13	54,89	29,95	1,50	5,00
432,36	109,08	611,95	174,53	0,14	0,14	36,84	28,24	1,60	5,70
305,98	92,11	485,57	157,56	0,19	0,17	32,72	24,00	2,10	6,30
284,72	119,75	464,32	232,85	0,20	0,23	48,65	29,29	2,20	4,30
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
362,34	129,15	577,33	213,66	0,19	0,16	44,03	29,28	1,78	4,92
Ucal= 0*		Ucal= 1*		Ucal= 6,5 ^{ns}		Ucal= 1*		Ucal= 0*	
p U = 0,004		p U = 0,008		p U = 0,133		p U = 0,008		p U = 0,004	

(*) Estatisticamente significativa para p< 0,01

(^{ns}) Não significativa

Tabela 7 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma, da espessura e da densidade numérica celular das células da camada granulosa do epitélio da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney.

Volume Citoplasmático (μm^3)		Volume Celular (μm^3)		Relação N/C		Espessura (μm)		Densidade Numérica Celular ($\text{N} \times 10^6/\text{mm}^3$)	
C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
439,01	196,35	618,60	261,80	0,14	0,09	14,99	14,72	1,60	3,80
590,10	145,41	769,69	258,51	0,11	0,20	14,15	7,76	1,30	3,90
141,11	174,53	320,70	239,98	0,33	0,11	10,72	10,93	3,10	4,20
131,95	376,34	245,04	441,79	0,21	0,05	10,67	12,43	4,10	2,30
261,23	301,59	440,82	414,69	0,21	0,12	13,06	20,73	2,30	2,40
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
512,68	238,84	478,97	323,35	0,20	0,11	12,71	17,46	2,48	3,32
Ucal= 12 ^{ns}		Ucal= 7 ^{ns}		Ucal= 3,5*		Ucal= 12 ^{ns}		Ucal= 6,5 ^{ns}	
p U = 0,500		p U = 0,155		p U = 0,038		p U = 0,500		p U = 0,133	

(*) Estatisticamente significativa para $p < 0,05$

(^{ns}) Não significativa

Tabela 8 - Valores médios da densidade de superfície, da espessura total do epitélio, da relação superfície externa/camada basal e da densidade numérica celular do epitélio total da gengiva inserida do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney.

Densidade de Superfície (mm^2/mm^3)		Espessura Total do Epitélio (μm)		Relação Superfície Externa /Camada Basal		Densidade Numérica Celular ($\text{N} \times 10^6/\text{mm}^3$)	
C	T	C	T	C	T	C	T
1,31	1,33	70,19	68,32	0,87	0,78	1,50	3,00
1,02	1,74	88,56	51,59	0,81	0,79	1,50	5,80
1,22	1,80	77,23	55,56	0,94	0,95	2,30	5,80
1,65	1,67	56,79	45,12	0,92	0,57	2,50	5,90
0,01	1,35	365,67	69,51	0,01	0,81	2,30	3,30
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
1,04	1,57	131,68	58,02	0,71	0,78	2,02	4,76
Ucal= 2**		Ucal= 2**		Ucal= 9,5 ^{ns}		Ucal= 0*	
p U = 0,016		p U = 0,016		p U = 0,309		p U = 0,004	

(**) Estatisticamente significativa para $p < 0,05$

(*) Estatisticamente significativa para $p < 0,01$

(^{ns}) Não significativa

Tabela 9 - Valores médios do volume citoplasmático, do volume celular, da relação núcleo/citoplasma e da densidade numérica celular das células do ligamento periodontal do 1º molar superior de ratos controles (C) e tratados (T) com zinco durante a lactação. Teste de Wilcoxon - Mann-Whitney.

Volume Citoplasmático (μm^3)		Volume Celular (μm^3)		Relação N/C		Densidade Numérica Celular ($\text{N} \times 10^6/\text{mm}^3$)	
C	T	C	T	C	T	C	T
443,69	156,35	556,79	221,80	0,08	0,12	1,80	4,50
237,69	107,23	303,14	140,74	0,08	0,07	3,30	7,10
387,76	162,41	500,86	227,86	0,09	0,11	2,00	4,40
158,07	155,89	223,52	221,34	0,11	0,12	4,50	4,50
260,03	89,36	325,48	122,87	0,07	0,08	3,10	8,10
$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$	$\bar{X}$
297,44	134,24	381,95	186,95	0,08	0,10	2,94	5,72
Ucal=1*		Ucal=1*		Ucal= 8 ^{ns}		Ucal=2**	
p U = 0,008		p U = 0,008		p U = 0,210		p U = 0,016	

(**) Estatisticamente significativa para $p < 0,05$

(*) Estatisticamente significativa para $p < 0,01$

(^{ns}) Não significativa