

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM EPITÉLIO LINGUAL DE
CAMUNDONGOS EXPOSTOS AO ÁLCOOL ETÍLICO A 40°GL

Júlio César Sanfelice

DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO PARTE DOS
REQUISITOS OBRIGATÓRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO
DE MESTRE EM ODONTOLOGIA, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL

Orientadora: Profa. Dra. Dalva Maria Pereira Padilha

Porto Alegre, Junho de 2001

Aos meus pais, Luiz Carlos e Lena, pelo sacrifício que se impuseram para que seus filhos tivessem a chance da educação, pelo amor e pelo carinho sempre presentes e pelo incentivo contínuo à minha formação, independente do caminho que escolhesse. Não chegaria a lugar algum sem eles.

À minha esposa, Gabriela, pelo amor, pela compreensão, pelo apoio incondicional em todos os instantes, pelo sacrifício de seus sonhos para que eu realizasse o meu, mas especialmente por ser a razão de meu viver. Não vou a lugar algum sem ela.

À minha orientadora, Profa. Dalva, por ter me recebido como a um filho e me incentivado no caminho da pesquisa, com carinho e liberdade. Não chegaria aqui se não tivesse sua orientação.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade e liberdade de estudar e conhecer um pouco mais da sua obra e assim ajudar aos meus semelhantes.

Aos camundongos, criaturas divinas, que me suportaram e permitiram que eu desenvolvesse o trabalho com tranquilidade por tão longo tempo.

À minha esposa, Gabriela, pelo que significa na minha vida, por me permitir compartilhar da dela, por seu amor, seu carinho, sua alegria, sua paciência, sua dedicação, seu estímulo, sua compreensão e apoio incondicionais.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Lena, pela vida física, pelo amor sempre presente, pela dedicação na educação e pelo estímulo constante à minha formação.

Às minhas irmãs, Eneida e Zaliana, pela grata felicidade de compartilharmos experiências e crescimento juntos, pelo carinho e apoio sempre presentes.

Aos meus avós, Júlio e Heloisa, Benevenuto e Ondina, por todos os momentos vividos juntos e pela experiência que pude aproveitar de suas vidas.

Aos meus sobrinhos, Marina, André e Lorenzo, por me mostrarem as alegrias da paternidade e os desafios da educação, pela alegria que trazem à nossa Casa.

Aos meus sogros, Cairú e Clair, pela força e exemplo de vida que são.

Aos meus cunhados Cezar, Alexandre, Cairu, Isabel e Carlos Frederico pela alegria que trazem às minhas irmãs e à minha esposa e pelas pessoas lindas que são.

Aos colegas de curso e aos demais colegas do Programa, pela convivência sempre humana, alegre e rica em experiências!

À amiga Elisabete Kasper, pela confiança e oportunidades proporcionadas.

À Isabel e à Carol, e agora também à Verônica, pela dedicação e cuidado na preparação de nossas lâminas e pela alegria sempre presente no Laboratório.

À Adriana e à Rose pela disposição e simpatia na secretaria do Programa.

Aos futuros colegas Luhana, Carla, Cláudia e Cézar pela ajuda que nos deram no trato com os animais durante o tempo do experimento.

À bióloga Patrícia e à Dra. Luísa, da Divisão de Experimentação Animal da FEEPS, pelo apoio, pela amizade, pela disponibilidade e esclarecimentos.

Aos professores participantes do PPGO, mas especialmente ao Prof. “Zeca” - da Genética - por ser e exemplificar o que é um verdadeiro mestre.

Aos professores Pantelis e Manoel pela paciência e dedicação em lapidar cascalhos transformando-os em Mestres através de uma educação em ciência baseada na busca incessante de saber científico e amor pelo que se faz.

E, finalmente, à minha orientadora, Profa. Dra. Dalva Maria Pereira Padilha pela forma carinhosa com que me acolheu como orientado, bem antes de eu haver pensado no mestrado e também pela liberdade com que me permitiu atuar mesmo sendo minha “dona”, por ter me direcionado e bem orientado no caminho da ciência.

RESUMO

O álcool nunca foi apontado como um carcinógeno isoladamente, a literatura se refere ao álcool como um elemento que facilitaria a atuação de um carcinógeno ou um elemento que agiria em sinergia juntamente com o tabaco no desenvolvimento do câncer bucal. Buscando avaliar o papel do álcool como modificador da morfologia da mucosa da língua realizamos o experimento com 60 camundongos divididos em três grupos – Controle, Álcool Contínuo e Álcool Tópico – durante o período de um ano. Os animais do Grupo Álcool Contínuo seguiram com a alimentação normal tendo sido substituída a bebida por álcool a 40°GL e os do Grupo Álcool Tópico recebiam aplicação tópica de álcool 40°GL duas vezes por semana, simulando um consumo eventual. Através de amostras retiradas do dorso da língua, no início do experimento e depois a cada seis meses, fez-se a análise de alterações morfológicas no epitélio (espessura do epitélio, espessura da camada de ceratina, relação entre comprimento da camada basal e superficial e relação núcleo citoplasma das células do epitélio (camada basal e intermediária)). Através de análise estatística dos resultados verificamos alterações significativas em quase todos os itens avaliados. Concluímos que o álcool pode ser apontado como um agente modificador da morfologia da mucosa do dorso da língua quando ingerido ou aplicado topicamente.

Unitermos: Álcool, Morfologia lingual, Mucosa bucal, Cavidade bucal : Efeito do álcool

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - Fotomicrografia de lâmina do Grupo Álcool Tópico, momento 12 meses, utilizada para cálculo da Relação entre a Camada Basal e Superficial do Epitélio, aumento de 320 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.....36
- Figura 2 – Fotomicrografias das lâminas utilizadas para o Cálculo da Espessura de Ceratina dos Grupos (A) Álcool Contínuo, (B) Álcool Tópico e (C) Controle, aos 6 meses, aumento de 320 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.....37
- Figura 3 – Fotomicrografias das lâminas utilizadas para o Cálculo da Espessura de Ceratina dos Grupos (A) Álcool Contínuo, (B) Álcool Tópico e (C) Controle, aos 12 meses, aumento de 320 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.38
- Figura 4 – Fotomicrografias das lâminas utilizadas para o Cálculo da Espessura de Ceratina do Grupo Controle no (A) momento inicial, (B) aos 6 meses e (C) aos 12 meses, aumento de 320 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.39
- Figura 5 – Fotomicrografias utilizadas para o Cálculo da Espessura de Ceratina do Grupo Álcool Contínuo (A) no momento inicial e (B) aos 12 meses, aumento de 320 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.....39
- Figura 6 – Fotomicrografias utilizadas para o Cálculo da Espessura de Ceratina do Grupo Álcool Tópico (A) no momento inicial e (B) aos 12 meses, aumento de 320 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.....40
- Figura 7 – Fotomicrografias utilizadas para o Cálculo da Relação Núcleo Citoplasma no Grupo Controle: (A) inicial, (B) 6 meses e (C) 12 meses, aumento de 400 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.43
- Figura 8 – Fotomicrografias utilizadas para o Cálculo da Relação Núcleo Citoplasma no Grupo Álcool Contínuo: (A) inicial, (B) 6 meses e (C) 12 meses, aumento de 400 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.43
- Figura 9 – Fotomicrografias utilizadas para o Cálculo da Relação Núcleo Citoplasma no Grupo Álcool Tópico: (A) inicial, (B) 6 meses e (C) 12 meses, aumento de 400 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.44
- Figura 10 – Fotomicrografias utilizadas para o Cálculo da Espessura do Epitélio no Grupo Controle: (A) inicial e (B) 12 meses, aumento de 250 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.47

Figura 11 – Fotomicrografias utilizadas para o Cálculo da Espessura do Epitélio no Grupo Álcool Contínuo: (A) inicial e (B) 12 meses, aumento de 250 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.47

Figura 12 – Fotomicrografias utilizadas para o Cálculo da Espessura do Epitélio no Grupo Álcool Tópico: (A) inicial e (B) 12 meses, aumento de 250 vezes, coloração por hematoxilina-eosina.48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio – no momento inicial	33
Tabela 2 – Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio – 06 meses	33
Tabela 3 – Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio – 12 meses	34
Tabela 4 – Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio – no Grupo Controle	34
Tabela 5 – Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio – no Grupo Álcool Contínuo	35
Tabela 6 – Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio – no Grupo Álcool Tópico	35
Tabela 7 – Comparação da espessura da camada de ceratina – no momento inicial	36
Tabela 8 – Comparação da espessura da camada de ceratina – 06 meses	37
Tabela 9 – Comparação da espessura da camada de ceratina – 12 meses	37
Tabela 10 – Comparação da espessura da camada de ceratina – no Grupo Controle	38
Tabela 11 – Comparação da espessura da camada de ceratina – no Grupo Álcool Contínuo	39
Tabela 12 – Comparação da espessura da camada de ceratina – no Grupo Álcool Tópico	40
Tabela 13 – Comparação da relação núcleo-citoplasma – no momento inicial	41
Tabela 14 – Comparação da relação núcleo-citoplasma – 06 meses	41
Tabela 15 – Comparação da relação núcleo-citoplasma – 12 meses	42
Tabela 16 – Comparação da relação núcleo-citoplasma – no Grupo Controle	42
Tabela 17 – Comparação da relação núcleo-citoplasma – no Grupo Álcool Contínuo	43

Tabela 18– Comparação da relação núcleo-citoplasma – no Grupo Álcool Tópico .44

Tabela 19 – Comparação da espessura do epitélio – no momento inicial	45
Tabela 20 – Comparação da espessura do epitélio – 06 meses	45
Tabela 21 – Comparação da espessura do epitélio – 12 meses	46
Tabela 22 – Comparação da espessura do epitélio – no Grupo Controle	46
Tabela 23 – Comparação da espessura do epitélio – no Grupo Álcool Contínuo	47
Tabela 24 – Comparação da espessura do epitélio – no Grupo Álcool Tópico	48
Tabela 25 – Análise dos pesos – Grupo Controle	49
Tabela 26 – Análise dos pesos – Grupo Álcool Contínuo	49
Tabela 27 – Análise dos pesos – Grupo Álcool Tópico	50
Tabela 28 – Análise dos pesos – 06 meses	50
Tabela 29 – Análise dos pesos – 12 meses	51
Tabela 30 – Análise dos pesos de ração consumida – entre os Grupos	51
Tabela 31 – Análise da quantidade de bebida consumida – por Grupos	52

LISTA DE ABREVIATURAS

°GL – Graduação Alcoólica de Gay-Lussac

PPGO – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

% - expressa um valor em percentual

ml – mililitros, unidade de volume

°C – Graus Centígrados, unidade de temperatura

°INPM – Graduação do Instituto Nacional de Pesos e Medidas, em bebidas representa o valor percentual de álcool presente na mistura

g – grama, unidade de peso

OIML – Sigla da *Organisation Internationale de Métrologie Légale*, França

ABNT – Sigla da Associação Brasileira de Normas Técnicas

OMS – Sigla da Organização Mundial da Saúde

oz – onças inglesas (*ounces*), unidade de volume

NNN – Nitrosornicotina, elemento presente no tabaco, considerado carcinogênico

DNA – Sigla em inglês do Ácido Desoxirribonucleico (ADN em português)

FEPPS – Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

GC – Grupo Controle

GAC – Grupo Álcool Contínuo

GAT – Grupo Álcool Tópico

P.A. – Pró-Análise

mm – milímetros, unidade de medida

n.º - número

µm – micrômetros, unidade de medida

MHz – Megahertz, unidade de frequência

Mb – Megabytes, unidade de medida de memória (informática)

RAM – Sigla em inglês de *Random Access Memory* (informática)

3D – Sigla que indica o uso de imagens em três dimensões

p – Indica o valor da probabilidade estatística

SUMÁRIO

Dedicatória	2
Agradecimentos	3
Resumo	5
Índice de Figuras	6
Índice de Tabelas	8
Lista de Abreviaturas	10
Introdução	13
Revisão de Literatura	14
Proposição	27
Material e Métodos	28
Resultados	33
Discussão	53
Conclusões	61
Summary	63
Referências Bibliográficas	64

INTRODUÇÃO

O consumo de bebidas alcoólicas é tão comum, que não as consideramos como uma droga, no Brasil este consumo é considerado um hábito. Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS) a taxa de mortalidade brasileira associada a neoplasia maligna de boca está entre as mais altas dentre 46 países avaliados (RIVEROS-ROSAS; JULIAN-SANCHEZ; PINÃ, 1997; FRANCO, 1987; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2000).

Tanto como um fator isolado como quando associado a outros fatores a ingestão crônica de álcool parece estar relacionada com o desenvolvimento de câncer naqueles pacientes que são suscetíveis. (MAIER; WEIDAUER, 1995; SIMANOWSKI et al., 1995; BORN et al.; 1996; SLOMIANY et al., 1998; OGDEN; WIGHT, 1998).

Os efeitos do álcool variam de acordo com a rapidez e a frequência com que ele é ingerido, com a quantidade de alimentos consumidos durante a ingestão de bebidas alcoólicas e com o peso da pessoa. O risco ao desenvolvimento de um câncer está relacionado com o consumo crescente e tem uma relação direta dose-efeito (MAIER; WEIDAUER, 1995; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2000).

Buscando avaliar se o álcool atua como modificador da morfologia da mucosa da língua realizamos um experimento com 60 camundongos durante o período de um ano. Os animais foram submetidos ao consumo contínuo de álcool a 40°GL e a aplicações tópicas de álcool duas vezes por semana. Através de amostras retiradas do dorso da língua, no início do experimento e depois a cada seis meses, fez-se a análise de alterações morfológicas no epitélio.

REVISÃO DE LITERATURA

O termo mucosa é utilizado para descrever o revestimento das cavidades do corpo que entram em comunicação com o exterior – trato digestivo, respiratório e urogenital. Nestes locais o epitélio e o tecido conjuntivo subjacente formam uma unidade funcional que recebe o nome de membrana. Assim, a mucosa bucal consiste em duas camadas: um epitélio estratificado escamoso e um tecido conjuntivo subjacente, que é a lâmina própria. A mucosa bucal forma o forro da cavidade bucal e apresenta modificações regionais correspondentes às necessidades funcionais. O palato e a gengiva de mastigação são ceratinizados, a superfície dorsal da língua para suas funções de gustação e mastigação é especializada. O epitélio da língua é também ceratinizado, e existem papilas gustativas numerosas localizadas neste epitélio. O epitélio da cavidade bucal é continuamente substituído por células basais que dividem-se e migram para a superfície sendo dissipadas durante a função normal de fala e mastigação (ROSS; ROWELL, 1993; SQUIER; HILL, 1994; FAWCETT, 1994).

O etanol, álcool etílico ou simplesmente álcool é um líquido incolor e volátil com um odor característico que é principalmente produzido por meio da fermentação de açúcares ou carboidratos através da ação de microrganismos como bactérias e leveduras. É um líquido de natureza polar¹, solúvel em água, clorofórmio e acetona, entre outros solventes, e é praticamente insolúvel em gorduras e óleos. (KATO; NOMURA, 1994; MAIER et al., 1994; MIKAMI; HASEBA; OHNO, 1997; RIVEROS-ROSAS; JULIAN-SANCHEZ; PINÃ, 1997; OGDEN; WIGHT, 1998; WIGHT; OGDEN, 1998;).

¹ Uma molécula será polar se os núcleos não estiverem distribuídos da mesma maneira que os elétrons, fazendo com que o centro da carga negativa não coincida com o centro da carga positiva, ou ainda se a densidade eletrônica de um grupo for diferente das demais regiões da molécula. (WANNMACHER; DIAS, 1979).

Assim que o etanol é ingerido, começa a ser absorvido através do epitélio da mucosa bucal e nos alvéolos pulmonares como vapor; contudo, a quantidade de etanol que é absorvida por estes dois caminhos é praticamente desprezível. Por esta razão pode-se considerar que todo o álcool ingerido vai ao estômago, onde é absorvido por difusão simples através do epitélio do estômago e intestino, até certo ponto, muito semelhante ao processo seguido pela água. Assim, chegando ao estômago, é absorvido e chega em proporções pequenas na circulação sanguínea através da mucosa gástrica (aproximadamente 20-30%). A maior quantidade é carregada através do estômago, indo em direção ao intestino delgado. É no intestino delgado, principalmente duodeno e jejuno, que a parte importante da absorção de etanol é executada. O álcool etílico é carregado em direção à veia Porta e de lá, transportado diretamente para fígado para ser metabolizado (RIVEROS-ROSAS; JULIAN-SANCHEZ; PINÃ, 1997; OGDEN; WIGHT, 1998; WIGHT; OGDEN, 1998;).

A graduação alcoólica é determinada pela quantidade de álcool presente em uma solução. Essa quantidade pode ser expressa em percentual de volume ou massa. A Graduação Alcoólica de Gay-Lussac (°GL), expressa o percentual em volume de álcool. Essa graduação indica a quantidade em mililitros (ml) de álcool absoluto contida em 100 ml de uma mistura hidro-alcoólica, a 15°C. A Graduação Alcoólica em relação ao peso (°INPM ou %), expressa o percentual em massa e indica a quantidade em gramas (g) de álcool absoluto contida em 100 g de uma mistura hidro-alcoólica, a 20°C (ABNT MB-239, 1957; ABNT EB-121, 1960; ABNT NBR 5992, 1980; ABNT NBR 5995, 1983).

Conforme ATHANÉ (2000) a graduação alcoólica °GL não é mais utilizada desde 1975 tendo sido substituída pelo sistema de alcoometria da OIML (na França)

e INPM (no Brasil), que utiliza a temperatura de 20°C como temperatura de referência e é representada pelos sinais %vol. ou % como unidades de titulação alcoólica em volume e massa respectivamente.

Não há uma relação direta entre as duas graduações e os cálculos existentes nas referências não trazem valores próximos aos encontrados nas bebidas alcoólicas existentes no mercado, mas pode-se afirmar que num mesmo valor expresso nas duas graduações, o que estiver indicado por °GL representará sempre uma maior concentração de álcool que o percentual (%). Como exemplo, temos que uma solução alcoólica com 85,60% corresponde à uma solução de 89,94 °GL (ABNT MB-239, 1957).

O consumo de bebidas alcoólicas é tão comum, que a maior parte das pessoas não percebe que o álcool é uma droga potente. O consumo de bebidas alcoólicas é um hábito social. No Brasil a relação entre álcool e câncer tem sido avaliada através de estudos de caso-controle, que conseguiram estabelecer a associação epidemiológica entre o consumo de álcool e cânceres da cavidade bucal e de esôfago. A taxa de mortalidade brasileira associada a neoplasia maligna de boca está entre as mais altas dentre 46 países avaliados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e a que responde pela maioria dos casos é o carcinoma epidermóide bucal (FRANCO, 1987; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2000).

Tanto como um fator isolado como quando associado com outros fatores a ingestão crônica de álcool parece estar relacionada com o desenvolvimento de câncer bucal em pacientes que são suscetíveis. O consumo conjunto de álcool e tabaco faz aumentar ainda mais o risco de câncer bucal, de faringe e de laringe supraglótica. Mas o etanol já é apontado como um iniciador do processo de carcinogênese através

de alterações celulares que pode causar e/ou predispor (MAIER; WEIDAUER, 1995; SIMANOWSKI et al., 1995; BORN et al.; 1996; SLOMIANY et al., 1998; OGDEN; WIGHT, 1998).

O álcool além de ser o agente causal da cirrose hepática, em associação com outros fatores de risco, como o vírus da hepatite B, está relacionado a 2-4% das mortes por câncer no país, e está implicado também, na gênese dos cânceres de fígado, reto e, possivelmente, mama. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o tipo de bebida (cerveja, vinho, cachaça, uísque, vodka) é indiferente, pois é o etanol (álcool etílico), propriamente, o agente agressor. Esta substância psicoativa tem a capacidade de produzir alteração no sistema nervoso central, podendo modificar o comportamento dos indivíduos que dela fazem uso. Por ter efeito prazeroso, induz à repetição e, assim, à dependência (BOFFETA et al., 1992; MAIER; WEIDAUER, 1995; WIGHT; OGDEN, 1998; MAIER et al. 1999; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2000).

Os efeitos do álcool variam de acordo com a rapidez e a frequência com que ele é ingerido, com a quantidade de alimentos consumidos durante a ingestão de bebidas alcoólicas, com o peso da pessoa e até mesmo com o estado de espírito desta pessoa. O álcool atinge a circulação sanguínea e, através dela, atinge todas as partes do corpo, inclusive o sistema nervoso, provocando, mesmo em doses pequenas, a diminuição da coordenação motora e dos reflexos, o estado de euforia e a desinibição. O risco ao desenvolvimento de um câncer está relacionado com o consumo crescente e tem uma relação direta dose-efeito (MAIER; WEIDAUER, 1995; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2000). Para SQUIER, COX e

HALL (1986) o risco de câncer bucal está aumentado naqueles que bebem álcool em baixas concentrações (5%), especialmente se considerarmos o sítio assoalho bucal.

Recorde-se que muitas doenças são causadas pelo uso contínuo do álcool: doenças neurais, mentais, musculares, hepáticas, gástricas, pancreáticas e entre elas o câncer. Isto sem falar nos problemas sociais que estão associados à ingestão de bebidas alcoólicas: acidentes de trânsito, homicídios, suicídios, faltas ao trabalho e atos de violência. Estes efeitos nocivos estão relacionados ao efeito tóxico do etanol e ao seu metabólito acetaldeído na proliferação da mucosa bucal – não aumentando, mas reduzindo - que parece desempenhar um importante papel na promoção de tumores (KATO; NOMURA, 1994; MAIER et al., 1994; WIGHT; OGDEN, 1998; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2000).

Alguns autores sugerem que o álcool teria um efeito imunossupressivo e que o seu consumo contínuo contribuiria para as deficiências nutricionais e para a redução de certas vitaminas e minerais que teriam ação protetora contra o desenvolvimento de um câncer (KATO; NOMURA, 1994; MAIER et al., 1994; MIKAMI; HASEBA; OHNO, 1997; RIVEROS-ROSAS; JULIAN-SANCHEZ; PINÃ, 1997; OGDEN; WIGHT, 1998; WIGHT; OGDEN, 1998;).

Existe uma dificuldade na padronização de pesquisas e trabalhos que procuram estudar os efeitos do álcool no organismo humano e, especialmente, na avaliação do papel do álcool no desenvolvimento do câncer, por não ser possível medir com precisão a quantidade, o tipo e a concentração de álcool consumida. Há também grande dificuldade na falta de precisão dos relatos de consumo fornecidos pelos pacientes e mais o fato de estes não consumirem apenas um tipo de bebida

alcoólica, apesar de os pesquisadores citados acreditarem que o tipo de bebida não influencia no efeito causado. Também esse é um ponto a ser considerado, pois não temos uma padronização de medidas/doses – existem diferentes tipos, como: bebida-padrão, unidades, gramas, onças ou equivalentes de uísque (DELEYIANNIS et al., 1996; OGDEN; WIGHT, 1998).

DELEYIANNIS et al. (1996) em seu trabalho relatam que apesar do reconhecimento da prevalência do alcoolismo em pacientes com câncer na região de cabeça e pescoço não é dada importância ao prognóstico do alcoolismo. Eles especulam que estes pacientes teriam um prognóstico pior que pacientes não alcoolistas em função de uma fase mais avançada do câncer, pelo efeito imunossupressivo e uma taxa aumentada de óbito em função de outras doenças relacionadas ao consumo de álcool. Para caracterizar os alcoolistas os autores determinaram que um aperitivo (“drink”) corresponderia a 12 *ounces* (onças inglesas – *oz*) de cerveja, ou a 4 *oz* de vinho ou 1,5 *oz* de licor, isto corresponde a aproximadamente 350 ml de cerveja (um caneco), 118 ml de vinho (um cálice de vinho tinto) e 44 ml de licor (pouco menos de 1/2 cálice de vinho tinto) e consideraram como alcoolista aquele que consome um ou mais “drinks” por semana e como abstêmio aquele que consome menos de um “drink” por semana.

Embora WIGHT e OGDEN (1998) afirmem que o etanol puro nunca foi demonstrado como sendo um agente carcinogênico em experiências laboratoriais, bebidas alcoólicas são reconhecidas como sendo um importante fator etiológico no desenvolvimento de câncer bucal, mesmo que ainda não se conheça o mecanismo. Devemos considerar ainda que algumas bebidas possuem algumas impurezas e/ou

contaminantes que poderiam ser carcinogênicos (KATO; NOMURA, 1994; OGDEN; WIGHT, 1998; WIGHT; OGDEN, 1998).

O câncer como patologia isolada não mereceria tanta atenção, pois não é, das doenças, a que causa maior mortalidade no mundo, mas do ponto de vista biológico a sua compreensão é um enorme desafio pois o câncer se origina de distúrbios, quebras nas regras fundamentais do comportamento celular num organismo pluricelular (ALBERTS et al., 1997).

Não é uma só alteração genética que causa o aparecimento de um câncer. Levando-se em consideração o enorme número de divisões celulares que ocorrem no corpo humano durante a vida (algo em torno de 10^{16}), mesmo que se desconsidere a participação de agentes mutagênicos, estima-se que teríamos algo como 10^{-6} mutações por gene por divisão celular. Poderíamos ter assim, durante a vida, 10^{10} ocasiões independentes de um gene desenvolver uma mutação e uma delas poderia estar relacionada ao controle de replicação celular ou ocorrer no gene que regula a proliferação celular. Pensando-se assim deveríamos nos questionar por que razão o câncer ocorre com baixa frequência (WEINBERG, 1996; ALBERTS et al., 1997).

O desenvolvimento de um câncer na maioria das vezes ocorre em várias etapas, que são coordenadas por variados fatores, alguns dependentes da carga genética do indivíduo outros dependem de fatores ambientais e do estilo de vida (RUOSLAHTI, 1996).

Hoje já são conhecidos e comprovados por vários trabalhos, alguns dos componentes genéticos envolvidos na carcinogênese. São algumas proteínas sintetizadas por genes que participam da regulação do ciclo celular e do crescimento celular, dentre estas podemos citar a proteína p53, a Ki-67, a mdm2, a família Bcl

(Bcl-2, Bcl-X, Bax) (ALBERTS et al., 1997; AGUIAR, ARAÚJO, 1997; HUNG, ANDERSON, 1997).

São três os tipos de agentes carcinógenos que estabelecem a ligação entre carcinogênese e mutagênese, os carcinógenos químicos, que causam mudanças locais na seqüência de nucleotídeos do DNA; a radiação ionizante, que pode causar quebra cromossômica e translocações; e os vírus, que podem introduzir DNA estranho em uma célula. O álcool se enquadra nos carcinógenos químicos (BAKER, 1997; INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2000).

DAY e BLOT (1992) em revisão de registros de casos de câncer realizados entre 1973 a 1987 nos Estados Unidos, avaliaram os riscos de desenvolvimento de um segundo câncer primário em paciente com diagnóstico de câncer bucal ou de faringe e concluíram que a taxa de desenvolvimento de um segundo tumor foi de 3,7% por ano, sendo o risco de desenvolvimento 2,8 vezes maior que o esperado e não decresciam mesmo após passados 5 anos após o primeiro diagnóstico, sendo os resultados iguais para homens e mulheres, independente da raça, apenas sendo mais freqüentes em pacientes com mais de 60 anos.

MAIER e WEIDAUER (1995) afirmam que o uso crônico de nicotina e álcool devem ser considerados como importantes fatores de risco para a carcinogênese na cavidade bucal, faringe e laringe. Os autores afirmam, que o risco de desenvolvimento de um câncer pelo álcool depende mais do consumo diário do que da natureza da bebida consumida e que álcool e nicotina trabalham em sinergia provocando um efeito multiplicativo no risco de aparecimento de um câncer.

MAIER et al.(1999a) investigando se o álcool pode ser um fator de risco independente, mesmo em consumo moderado, no desenvolvimento de câncer de

boca, laringe e faringe em mulheres, concluíram que mesmo um consumo de 10 a 20 g por dia causa um aumento significativo no risco de aparecimento de câncer de cabeça e pescoço em mulheres. Os autores afirmam também que o risco associado ao álcool era dose-dependente.

Carcinomas de língua são lesões agressivas requerendo diagnóstico e tratamento eficientes, pois a arquitetura da musculatura da língua não oferece resistência ao desenvolvimento de um tumor podendo a lesão chegar a grande tamanho antes de manifestar-se qualquer sintoma. Após o de lábio, é o câncer de língua o mais comum na cavidade bucal, representando de 20 a 50% das lesões de câncer bucal (KRUPALA; GIANOLI, 1993).

Sugere-se que o álcool aumenta a penetração de carcinógenos pela mucosa bucal, agindo ou por solubilização maior destes ou por aumento da permeabilidade da mucosa bucal (OGDEN; WIGHT, 1998; WIGHT; OGDEN, 1998). RIVEROS-ROSAS, JULIAN-SANCHEZ e PINÃ (1997) explicam a passagem do etanol através da mucosa e da membrana celular em razão do pequeno tamanho de sua molécula.

SQUIER, COX e HALL (1986) buscando entender o mecanismo sinérgico existente na atuação do tabaco e álcool avaliaram a penetração de um carcinógeno do tabaco (nitrosonornicotina – NNN) na mucosa bucal associando-a ao álcool. Utilizando concentração de 5% e 50% de etanol, encontraram uma permeabilidade aumentada na mucosa do assoalho bucal apenas na concentração de 5%, após várias pequenas exposições espaçadas ao etanol. A concentração de 50% não alterou significativamente a permeabilidade da mucosa, com exceção da mucosa jugal. Tais resultados indicam ser o assoalho bucal uma área de alto risco para o

desenvolvimento de um carcinoma e que os fumantes e alcoolistas têm um risco relativo aumentado, especialmente aqueles que consomem bebidas com baixa concentração alcoólica – como é o caso da cerveja (6%) e do vinho (10 a 11,5%). Os autores chamam a atenção de que a concentração de 5% de álcool é encontrada nos enxaguatórios bucais e também em alguns medicamentos infantis, como xaropes.

Resultados coincidentes foram encontrados por DU et al. (2000) que também estudaram a permeabilidade da mucosa bucal ao carcinógeno – nitrosornicotina (NNN) – associado ao etanol em diversas concentrações (de 5 a 50%). Os autores explicam a redução na permeabilidade da mucosa na concentração de 50% de etanol por um efeito fixador deste sobre a mucosa e concluem que a associação etanol-nicotina aumenta significativamente a penetração de NNN na mucosa. Concluem, ainda, que os resultados deste estudo sugerem que se possa explicar a sinergia entre tabaco e álcool na etiologia do câncer bucal pela permeabilidade que o álcool provoca na mucosa permitindo e facilitando a entrada de carcinógenos do tabaco e outros através da mucosa bucal.

MAIER et al. (1994) avaliando o efeito do uso crônico de álcool sobre a morfologia da mucosa bucal de ratos através de análise morfométrica, concluíram que o consumo crônico do álcool causa uma atrofia na mucosa bucal seguida de uma intensa proliferação da mucosa que está associada a uma suscetibilidade aumentada aos efeitos de carcinógenos químicos.

HOMANN et al. (1997) estudando o efeito do aldeído – derivado do metabolismo tecidual do etanol – nos tecidos bucais através da administração sistêmica de 120 mg de acetaldeído na mucosa bucal de ratos por um período de 08

meses, encontrou produção de hiperplasia e hiperproliferação do trato gastrointestinal superior, inclusive a língua.

MACCLUSKEY et al. (1999) buscando examinar uma possível associação entre proliferação epitelial e progressão de lesões em mucosa bucal fizeram marcação de proliferação celular utilizando o anticorpo Ki-67 e encontraram significativo incremento no índice de proliferação epitelial quando comparados os diferentes espécimes utilizados (mucosa normal, displasia e carcinoma epidermóide), mas não encontraram associação entre o índice de proliferação e o consumo de tabaco ou álcool.

OGDEN, WIGHT e COWPE (1999) avaliando o efeito do consumo crônico de álcool na distribuição do DNA e na área das células da mucosa bucal normal através de um estudo utilizando citologia esfoliativa, concluíram que a ingestão crônica do álcool está associada com uma redução na área total das células, mas não parece ter efeito sobre o conteúdo de DNA nuclear. Os autores fazem referência a um trabalho prévio (OGDEN; WIGHT, 1998) onde utilizaram a mesma técnica e concluíram que cânceres bucais são frequentemente não diplóides, e sugerem que um histograma de distribuição de DNA não diplóide em paciente etilista deveria indicar uma biópsia da lesão, pois tal resultado não seria atribuído apenas ao uso do álcool.

OLIVEIRA et al. (1994) buscando avaliar morfometricamente as alterações no epitélio de língua dos fetos de ratas que receberam aguardente de cana concluíram que o alcoolismo materno durante a gestação induz retardo no crescimento e diferenciação celular no epitélio da língua do feto, com aumento do volume nuclear, citoplasmático e celular, diminuição da espessura do epitélio e da camada de ceratina, além da diminuição da densidade numérica celular.

MAIER et al. (1999b) estudando o efeito do consumo de álcool sobre a mucosa da região da glote de ratos encontraram uma redução significativa na espessura do epitélio desta região, tanto em sua comissura anterior como posterior, mas não encontraram diferenças entre os núcleos das células da camada basal dos ratos submetidos ao álcool e dos ratos controle. Concluem que a redução da espessura epitelial desta região pode sugerir uma maior facilidade de ação local de carcinógenos químicos.

OGDEN, WIGHT e RICE (1999) utilizando a citomorfologia quantitativa de raspados da mucosa bucal em pacientes que faziam uso de álcool de forma contínua e eventual encontraram diferenças significantes nas áreas de núcleo e citoplasma quando comparados os resultados obtidos nos pacientes controle (sem álcool) e consumidores (com álcool). Nenhuma diferença significativa foi encontrada quando comparados os grupos consumidores de álcool.

LARENTIS et al. (2000) utilizando-se do método de análise citopatológica em raspados de bordo de língua de camundongos expostos ao consumo de álcool a 40°GL de forma contínua e eventual observaram uma diminuição no número de células nucleadas nos grupos que foram submetidos ao álcool quando comparados ao controle. Observaram ainda uma maior frequência de células anucleadas nos grupos expostos ao álcool, sendo que no grupo que recebeu aplicações tópicas esta frequência foi ainda maior. Segundo os autores estes resultados podem indicar um aumento de ceratinização da mucosa e uma diminuição da adesividade celular provocados pelo efeito do álcool de modo direto (tópico e não sistêmico).

KUYAMA e YAMAMOTO (1997) estudando os efeitos do uso de enxaguatórios bucais sobre a mucosa bucal de humanos através de análise

citopatológica de esfregaços de diferentes sítios da boca concluíram que estes produtos provocam um aumento na descamação de células do epitélio de revestimento da mucosa e, também, observaram uma presença aumentada de células inflamatórias nestes esfregaços quando realizados 30 segundos e até 1 hora após o uso do enxaguatório. Os autores concluem que estes resultados mostram que o alto conteúdo de álcool destes produtos e a presença de outros irritantes, como o pH baixo, podem constituir-se em agentes irritantes que atuam de forma isolada ou em sinergia. Eles também chamam a atenção para o fato de que a indução de reações da mucosa bucal ao álcool é de interesse para as investigações sobre a epidemiologia do câncer bucal.

SIMANOWSKI et al. (1995) demonstrou através de análise morfológica que o consumo crônico de etanol aumentou o tamanho dos núcleos das células basais na mucosa bucal, tanto no assoalho de boca como na extremidade e base da língua. Encontraram também uma atrofia da mucosa bucal, e observaram que a ingestão crônica do etanol estimulou significativamente a taxa de reprodução celular nas células da cripta do reto. Assim concluem que o consumo crônico de álcool promove uma intensa proliferação da mucosa gástrica e também bucal e que este fato estaria relacionado com o aparecimento de câncer bucal, sendo um dos mecanismos pelo qual o álcool mostraria seu efeito carcinógeno. Ressaltam os autores que estes mesmos resultados podem ser confirmados em humanos.

PROPOSIÇÃO

A proposição do trabalho é avaliar o efeito do consumo de álcool sobre a morfologia do epitélio do dorso da língua de camundongos que foram expostos ao consumo de álcool a 40°GL de forma continuada ou receberam aplicações tópicas duas vezes por semana, durante o período de 12 meses.

Como forma de avaliação da morfologia foram mensurados e avaliados estatisticamente os seguintes itens:

- Relação entre o comprimento da camada basal e superficial;
- Espessura da camada de ceratina;
- Relação núcleo-citoplasma das células das camadas basal e supra basal;
- Espessura do epitélio.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 60 camundongos (*Mus domesticus domesticus*), da linhagem CF1, fêmeas, hípidas, virgens e heterogênicas, com dois meses de idade e peso médio inicial de 32 gramas, que foram adquiridos na Divisão de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS.

Os camundongos foram separados em três grupos com 20 animais cada. O primeiro foi identificado como GRUPO CONTROLE (GC), e seguiu com alimentação e bebida *ad libitum*. O segundo foi identificado como GRUPO ÁLCOOL CONTÍNUO (GAC), e foi submetido ao consumo contínuo de álcool etílico (Álcool etílico, P.A. – etanol absoluto marca Reagen[®] – fabricante Quimibrás Indústrias Químicas S.A. – Rio de Janeiro – RJ), na graduação de 40°GL, que lhe foi fornecido através do recipiente – chamado de “mamadeira” - onde normalmente é fornecida a água. O terceiro foi identificado como GRUPO ÁLCOOL TÓPICO (GAT), e recebeu aplicação tópica de álcool, na mesma graduação alcoólica do grupo álcool contínuo. Esta aplicação tópica foi realizada utilizando-se uma seringa para aplicação de insulina (volume de 01 ml) sem agulha. A aplicação era realizada introduzindo-se a ponta da seringa na cavidade bucal dos camundongos e irrigando-se esta com o volume total da seringa, por uma vez apenas, duas vezes por semana. Tal procedimento se dava com o camundongo imobilizado pela cauda e pelo cangote, mantendo-se a cabeça voltada para baixo. Não se fazia uso de analgesia para este procedimento.

Os três grupos seguiram se alimentando com a ração NUVILAB/CR1[®] (fabricante NUVITAL Nutrientes Ltda. - Colombo – Paraná - PR).

Foram avaliados, semanalmente, o volume (em mililitros) de água e de álcool etílico consumidos e o peso de ração consumida. Durante o período experimental os camundongos permaneceram nas instalações do Biotério da Divisão de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde - FEPPS.

Os animais, foram submetidos à coleta de material para exame através da remoção de uma amostra da mucosa lingual (dorso) utilizando-se um “punch” de biópsia de 03 mm de diâmetro (*Biopsy Punch*[®] – fabricante *Stiefel Laboratorium GmbH* – importado e distribuído por Laboratórios Stiefel Ltda. - Guarulhos – SP) e um cabo de bisturi – modelo Bard-Parker, montado com uma lâmina n.º 12, sendo a amostra (peça cirúrgica) colocada com seu lado cruento sobre papel absorvente - para evitar distorções na fixação - e fixada em formalina tamponada (formol a 10%) por 24 horas. Para este procedimento os animais foram sedados por inalação de éter (Éter Sulfúrico Techn – Importadora Química Delaware Ltda.). Cada amostra recebeu identificação individual conforme registro no livro do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Esta coleta foi realizada no 1º (inicial), 6º e 12º mês do experimento, totalizando 03 coletas com um intervalo de 06 meses entre uma e outra.

As biópsias foram realizadas sob condições de higiene, mas não assépticas, o instrumental foi desinfetado entre um procedimento e outro com algodão hidrofílico embebido em álcool iodado.

Ao final do período experimental os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical com analgesia prévia, e dissecados, tendo sido recolhidos e guardados seus órgãos internos e esqueleto para futuros trabalhos.

As peças fixadas em formalina, passadas as 24 horas de fixação, foram processadas para inclusão em parafina histológica, utilizando-se o equipamento histotécnico marca OMA, modelo CM 69. Após emblocadas em parafina foram realizados cortes de 04 μm , no micrótomo LEICA – modelo RM2155. Foram, então, preparadas lâminas que receberam coloração de rotina por hematoxilina-eosina conforme seqüência de coloração utilizada no Laboratório.

Para avaliação e quantificação dos itens propostos utilizou-se o Sistema de Processamento e Análise de Imagens – IMAJELAB[®] - versão 2.3 e o IMAGE-TOOL[®], versão 1.20, instalados em um computador marca UNISYS[®] – modelo Aquanta DX (Processador Pentium[®] MMX 200 MHz - 64 Mb memória RAM – Sistema Operacional Microsoft Windows[®] 95 Plus! – Monitor TEC, 17 polegadas, colorido, doth pitch 0.28, Placa de Vídeo Matrox 3D) associado a um microscópio marca ZEISS – modelo Standard 20 - que tem acoplado uma câmara de vídeo marca JVC[®] modelo TK-C620U, colorida, para a captação das imagens microscópicas e sua transferência para o computador.

Para a realização da medição da espessura do epitélio realizou-se a captura de imagens de microscopia das lâminas utilizando-se o aumento de 250 vezes, pois este era o único que permitia uma visão completa da peça. Utilizando-se a ferramenta de medição de retas do sistema IMAJELAB[®], calibrado para o sistema métrico (mm), tomávamos cinco pontos para a medição. Estes pontos eram distribuídos ao longo de todo o comprimento do epitélio, sendo distribuídos da seguinte forma: uma medição em cada extremidade, uma no centro e outras duas localizadas na porção média entre cada uma das extremidades e o centro. Os valores obtidos eram lançados numa

planilha eletrônica (MS-Excel) que realizava o cálculo da média do comprimento para cada uma das lâminas. Para os cálculos estatísticos utilizou-se a média dos valores encontrados em cada grupo.

Para a realização do cálculo da relação núcleo-citoplasma realizou-se a captura de imagens de microscopia das lâminas utilizando-se o aumento de 400 vezes, pois este era o que permitia a visualização dos limites celulares. De cada lâmina obteve-se duas imagens diferentes e em cada uma dessas realizou-se a tomada da área de dez células diferentes distribuídas na camada basal e intermediária do epitélio. Utilizando-se a ferramenta de cálculo de áreas do sistema IMAGE-TOOL[®] fazíamos a marcação das áreas do núcleo e do citoplasma. O sistema nos fornecia diretamente os valores e estes eram lançados numa planilha eletrônica (MS-Excel) que realizava o cálculo da relação, sendo sempre o cálculo realizado dividindo-se o valor da área do núcleo pelo valor da área do citoplasma. Assim a relação núcleo-citoplasma nos diz o quanto significa a área do núcleo em relação ao citoplasma. Quanto mais próximo de um esta relação maior é o núcleo celular. Para os cálculos estatísticos utilizou-se a média dos valores encontrados em cada grupo.

Para a realização da medição da espessura da camada de ceratina realizou-se a captura de imagens de microscopia das lâminas utilizando-se o aumento de 320 vezes, e selecionou-se uma área do epitélio aleatoriamente onde fosse possível ver-se toda a espessura do epitélio e a camada de ceratina. Utilizando-se a ferramenta de medição de retas do sistema IMAJELAB[®] tomávamos cinco pontos para a medição. Estes pontos eram distribuídos ao longo de toda a imagem da camada de ceratina, sendo distribuídos da seguinte forma: uma medição em cada extremidade, uma no centro e outras duas localizadas na porção média entre cada uma das extremidades e

o centro. Os valores obtidos eram lançados numa planilha eletrônica (MS-Excel) que realizava o cálculo da média do comprimento para cada uma das lâminas. Para os cálculos estatísticos utilizou-se a média dos valores encontrados em cada grupo.

Para a realização da medição da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio realizou-se a captura de imagens de microscopia das lâminas utilizando-se o aumento de 320 vezes – foram utilizadas as mesmas imagens utilizadas no cálculo da espessura da camada de ceratina. Utilizando-se a ferramenta de medição de retas do sistema IMAJELAB[®] toda a extensão da camada basal e superficial eram mensuradas através da tomada de segmentos consecutivos e interligados reproduzindo-se assim a irregularidade de cada uma das regiões. Os valores obtidos eram lançados numa planilha eletrônica (MS-Excel) que realizava o cálculo da relação dos comprimentos para cada uma das lâminas. Para os cálculos estatísticos utilizou-se a média dos valores encontrados em cada grupo.

Após a coleta e tabulação dos dados realizamos análise estatística utilizando os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, de Friedman e a Análise da Variância (ANOVA) conforme a natureza dos dados.

Este trabalho está de acordo com a Declaração Universal dos Direitos Animais e os princípios éticos na experimentação animal emitidos pelo Código Brasileiro de Experimentação Animal (GOLDIM, 1997) e recebeu parecer favorável da Comissão de Ética da Faculdade de Odontologia em 27 de Janeiro de 2001 conforme Processo n.º PPGO 40/99.

RESULTADOS

- DA RELAÇÃO ENTRE O COMPRIMENTO DA CAMADA BASAL E SUPERFICIAL

A mensuração desta relação é entendida por nós como um indicador do índice de proliferação do epitélio e é considerada pela razão entre o comprimento da camada basal dividido pelo comprimento da camada superficial, quanto maior o valor, maior é a camada basal e com isso maior a área de proliferação epitelial.

Tabela 1. Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio, entre os grupos, no momento inicial.

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	1,08	0,24	30,50	0,356
Álcool Contínuo	1,12	0,29	30,00	
Álcool Tópico	1,00	0,25	23,74	

teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

Os dados apresentados nos mostram que não houve diferença entre os grupos, no momento inicial, pois não foram verificadas diferenças estatísticas significativas na relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio entre os grupos estudados. Fato que era esperado sendo este o momento inicial do experimento e ainda não havíamos exposto os animais às variáveis (álcool e tempo).

Tabela 2. Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio, entre os grupos, no momento 6 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	1,38	6,36	31,56	0,06
Álcool Contínuo	1,16	4,81	24,13	
Álcool Tópico	1,05	6,16	19,65	

teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

Conforme os dados da Tabela 2 podemos observar que também, no momento de 6 meses, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas na relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio entre os grupos estudados.

Tabela 3. Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio, entre os grupos, no momento 12 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	1,27	0,35	23,88	0,824
Álcool Contínuo	1,21	0,32	21,71	
Álcool Tópico	1,27	0,36	24,73	

teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

Da mesma forma, os dados apresentados na Tabela 3 nos mostram que não foram verificadas diferenças estatísticas significativas na relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio entre os grupos estudados.

Tabela 4. Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio, entre os tempos, no grupo controle

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	1,08	0,24	19,61	0,06
Biópsia 6 meses	1,39	0,46	31,44	
Biópsia 12 meses	1,27	0,35	27,65	

teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

A observação dos dados apresentados na Tabela 4 nos mostra que houve variação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio estudada ao longo do tempo no Grupo Controle, mas esta não foi estatisticamente significativa.

Tabela 5. Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio, entre os tempos, no grupo álcool contínuo.

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	1,12	0,29	22,33	0,67
Biópsia 6 meses	1,16	0,32	25,00	
Biópsia 12 meses	1,21	0,32	26,71	

teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

Também, assim como na Tabela 4, vemos pelos dados apresentados na Tabela 5 que a relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio no Grupo Álcool Contínuo ocorreu ao longo do período experimental, mas não foi estatisticamente significativa.

Tabela 6. Comparação da relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio, entre tempos, no grupo álcool tópico.

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	1,00	0,22	20,74 ^A	0,03
Biópsia 6 meses	1,05	0,18	24,82 ^A	
Biópsia 12 meses	1,27	0,36	34,00 ^B	

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis

Podemos observar através dos resultados na Tabela 6 que foram verificadas diferenças estatísticas significativas na relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio para os tempos estudados no Grupo Álcool Tópico. Observa-se que o valor da relação é superior na biópsia de 12 meses ($p=0,03$).

Podemos observar o que os dados nos mostram através da imagem da figura 1 que mostra uma fotomicrografia do Grupo Álcool Tópico no momento de 12 meses.



Figura 1. Fotomicrografia de lâmina do Grupo Álcool Tópico, momento 12 meses, onde observa-se a camada basal (seta amarela) bastante maior em relação à camada superficial do epitélio (seta vermelha). HE, 320X.

- ESTUDO DA ESPESSURA DE CERATINA

A mensuração desta espessura é entendida por nós como um indicador do índice de descamação do epitélio, quanto menor o valor, menor é a espessura da camada de ceratina e indica um alto índice de descamação.

Tabela 7. Comparação da espessura da ceratina, entre os grupos, no momento inicial.

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	22,39	5,13	24,72	0,339
Álcool Contínuo	23,27	5,17	26,83	
Álcool Tópico	26,54	7,79	32,21	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas com relação à espessura da ceratina entre os grupos estudados, no tempo inicial.

Tabela 8. Comparação da espessura da ceratina, entre os grupos, no momento 6 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Controle	31,74	6,35	35,75 ^A	0,01
Álcool Contínuo	24,15	4,81	17,94 ^B	
Álcool Tópico	25,09	6,15	21,53 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas com relação à espessura da ceratina entre os grupos estudados. Observa-se que o Grupo Controle apresentou espessura maior após 6 meses. ($p=0,01$)

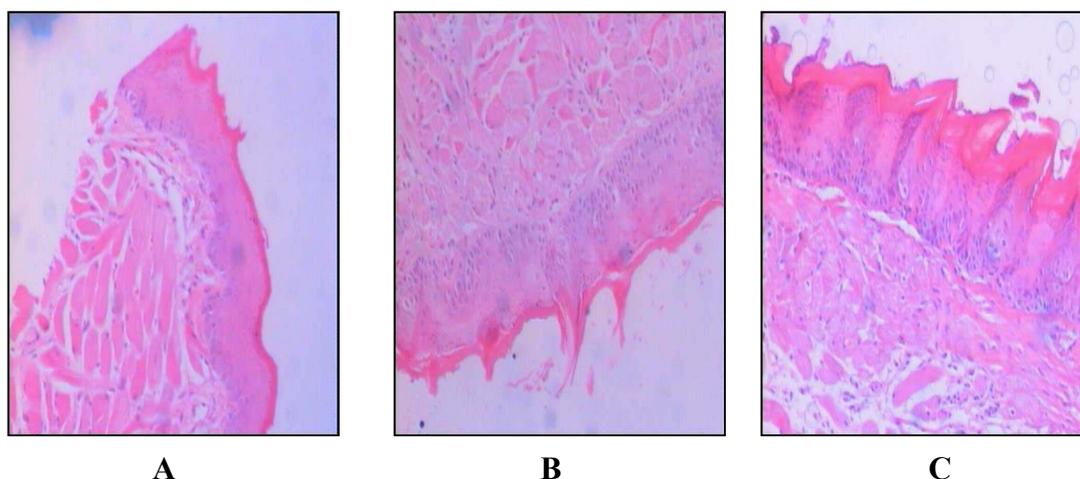


Figura 2. Fotomicrografias das lâminas utilizadas para o cálculo da espessura de ceratina dos Grupos (A) Álcool Contínuo, (B) Álcool Tópico e (C) Controle, aos 6 meses. HE, 320X

Tabela 9. Comparação da espessura da ceratina, entre os grupos, no momento 12 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	29,82	7,74	33,71 ^A	0,01
Álcool Contínuo	22,51	3,69	19,36 ^B	
Álcool Tópico	21,23	7,30	15,80 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas com relação à espessura da ceratina entre os grupos estudados. Observa-se que no Grupo Controle a camada de ceratina era mais espessa após 12 meses. (p=0,01)

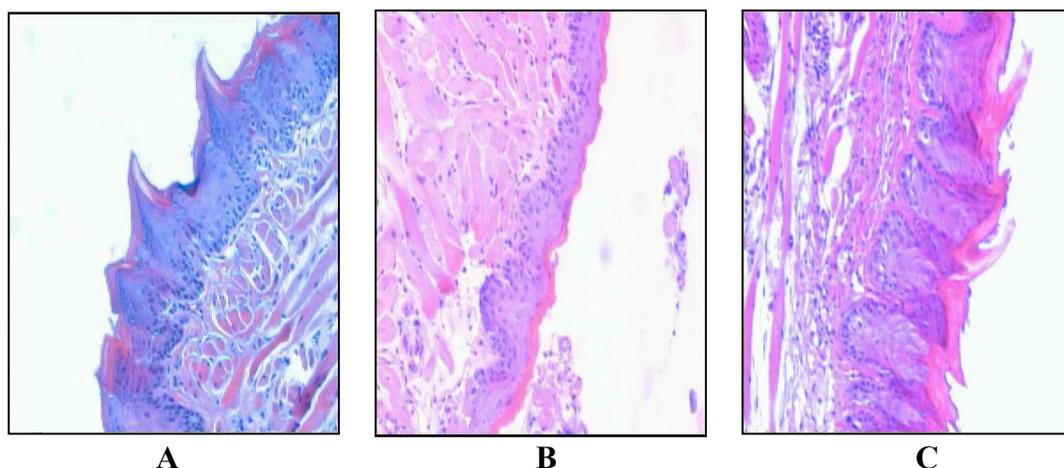


Figura 3. Fotomicrografias das lâminas utilizadas para o cálculo da espessura de ceratina dos Grupos (A) Álcool Contínuo, (B) Álcool Tópico e (C) Controle, aos 12 meses. HE, 320X

Tabela 10. Comparação da espessura da ceratina, entre os tempos, no grupo controle

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	22,39	5,13	14,06 ^A	0,01
Biópsia 6 meses	31,74	6,36	34,94 ^B	
Biópsia 12 meses	29,82	7,74	30,24 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas considerando a espessura da ceratina do Grupo Controle nos diferentes tempos do experimento. Observa-se que na biópsia inicial a espessura da ceratina era menor e que a mesma foi aumentando até os seis meses, não havendo, no entanto diferença significativa entre os valores encontrados no 6º e 12º mês. (p=0,01)

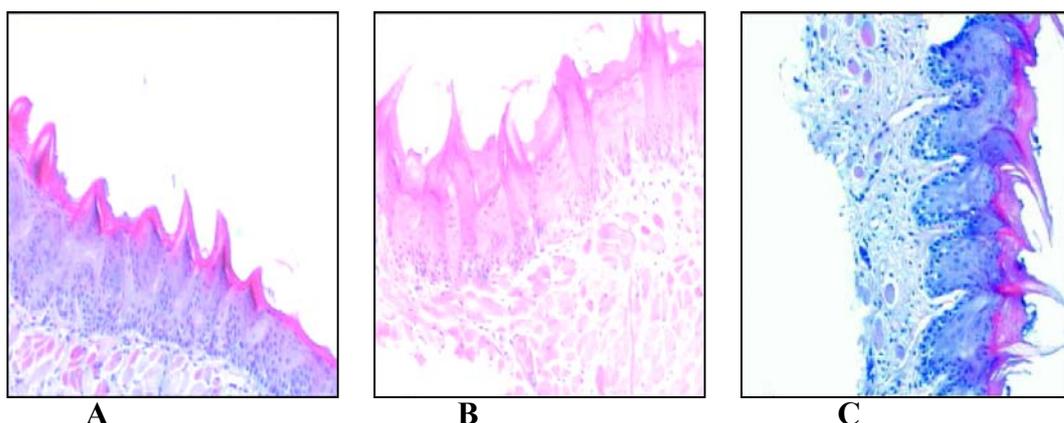


Figura 4. Fotomicrografias das lâminas utilizadas para o cálculo da espessura de ceratina do Grupo Controle no (A) momento inicial, (B) aos 6 meses e (C) aos 12 meses. HE, 320X

Tabela 11. Comparação da espessura da ceratina, entre os tempos, no grupo álcool contínuo

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	23,27	5,18	23,50	0,50
Biópsia 6 meses	24,15	4,81	27,75	
Biópsia 12 meses	22,51	3,69	22,07	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas considerando a espessura da ceratina nos animais que foram submetidos à ingestão contínua de álcool em diferentes momentos de análise.

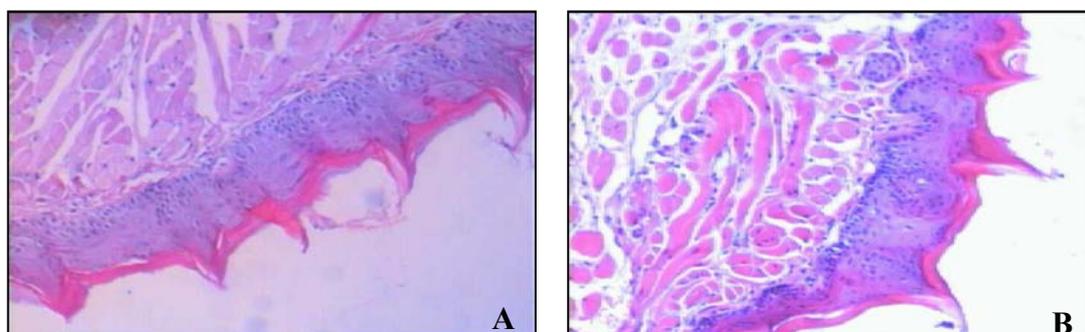


Figura 5. Fotomicrografias utilizadas para o cálculo da espessura de ceratina do Grupo Álcool Contínuo (A) no momento inicial e (B) aos 12 meses. HE, 320X

Tabela 12. Comparação da espessura da ceratina, entre os tempos, no grupo álcool tóxico

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	26,54	7,80	29,37 ^A	0,05
Biópsia 6 meses	25,09	6,15	29,18 ^A	
Biópsia 12 meses	21,23	7,30	18,13 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas com relação à espessura da ceratina para os momentos estudados. Observa-se que o valor da espessura da ceratina é menor na biópsia de 12 meses. Esta observação no diz que a espessura de ceratina é menor ao longo do tempo. ($p=0,05$)

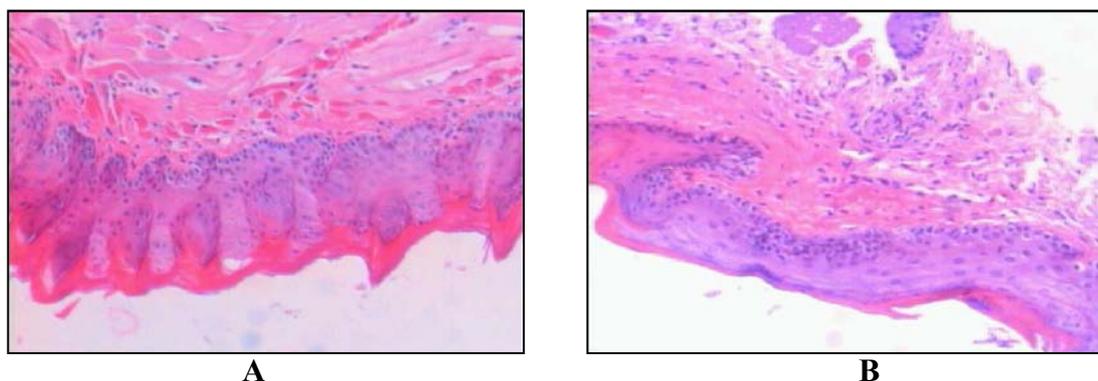


Figura 6. Fotomicrografias utilizadas para o cálculo da espessura de ceratina do Grupo Álcool Tóxico (A) no momento inicial e (B) aos 12 meses. HE, 320X

- RELAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMA

A relação núcleo-citoplasma nos mostra a proporção do tamanho do núcleo em relação ao tamanho do citoplasma e é considerada pela razão entre a área do núcleo e a área do citoplasma. É entendido que esta relação aumentada indica um núcleo mais ativo, mais produtivo e pode ser relacionada esta informação com atividade celular (nuclear) aumentada, que pode ser no sentido de proliferação.

Tabela 13. Comparação da relação núcleo-citoplasma, entre os grupos, no momento inicial

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	0,46	0,11	83,02	0,26
Álcool Contínuo	0,49	0,15	89,95	
Álcool Tópico	0,50	0,12	98,53	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a relação entre os grupos estudados. Estes resultados mostram não haver diferença quanto a relação núcleo-citoplasma entre os grupos no momento inicial do trabalho experimental.

Tabela 14. Comparação da relação núcleo-citoplasma, entre os grupos, no momento 6 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Controle	0,51	0,09	106,70 ^A	0,01
Álcool Contínuo	0,46	0,13	83,28 ^B	
Álcool Tópico	0,45	0,12	81,52 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a relação nos grupos estudados. Observa-se que o Grupo Controle apresentou valores superiores, o que é entendido como aumento da atividade nuclear. (p=0,01)

Tabela 15. Comparação da relação núcleo-citoplasma, entre os grupos, no momento 12 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	0,55	0,14	97,25	0,46
Álcool Contínuo	0,50	0,09	87,82	
Álcool Tópico	0,52	0,19	86,43	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a relação nos grupos estudados. Observa-se nesta Tabela que os valores das médias nos três grupos foram muito próximas.

Tabela 16. Comparação da relação núcleo-citoplasma, entre os tempos, no grupo controle

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	0,46	0,11	71,85 ^A	0,01
Biópsia 6 meses	0,51	0,09	93,97 ^{AB}	
Biópsia 12 meses	0,55	0,14	105,68 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a relação entre os grupos estudados. Observa-se que na biópsia inicial a relação foi inferior à relação na biópsia de 6 e 12 meses, sendo significativa estatisticamente apenas quando comparados os valores da relação entre o tempo inicial e 12 meses e o tempo de 6 e 12 meses. (p=0,01)

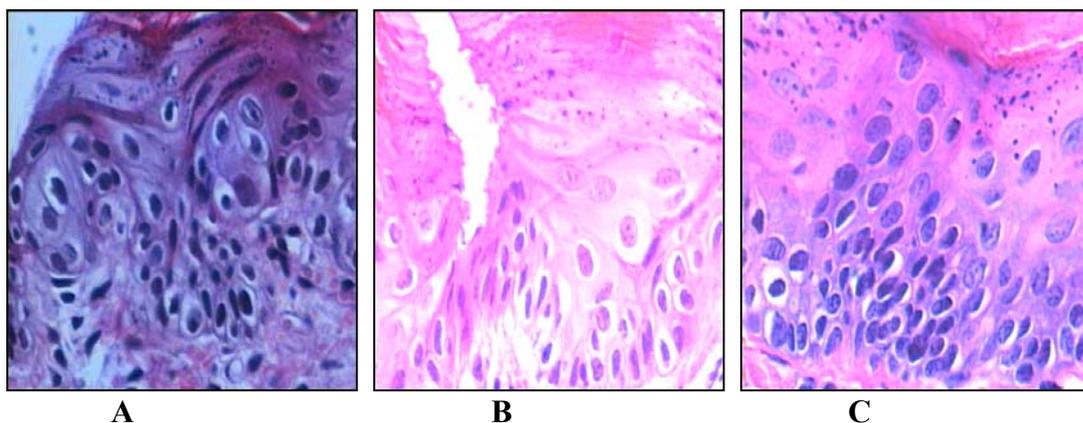


Figura 7. Fotomicrografias utilizadas para o cálculo da relação núcleo citoplasma no Grupo Controle: (A) inicial, (B) 6 meses e (C) 12 meses. HE, 400X

Tabela 17. Comparação da relação núcleo-citoplasma, entre os tempos, no grupo álcool contínuo

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	0,49	0,15	87,97 ^A	0,02
Biópsia 6 meses	0,46	0,13	79,03 ^A	
Biópsia 12 meses	0,50	0,09	104,50 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a relação para os momentos estudados. Observa-se que o valor da relação é superior na biópsia de 12 meses. Este fato sugere que as alterações celulares em animais expostos ao álcool talvez só possam ser avaliadas após mais de 6 meses de exposição. ($p=0,02$)

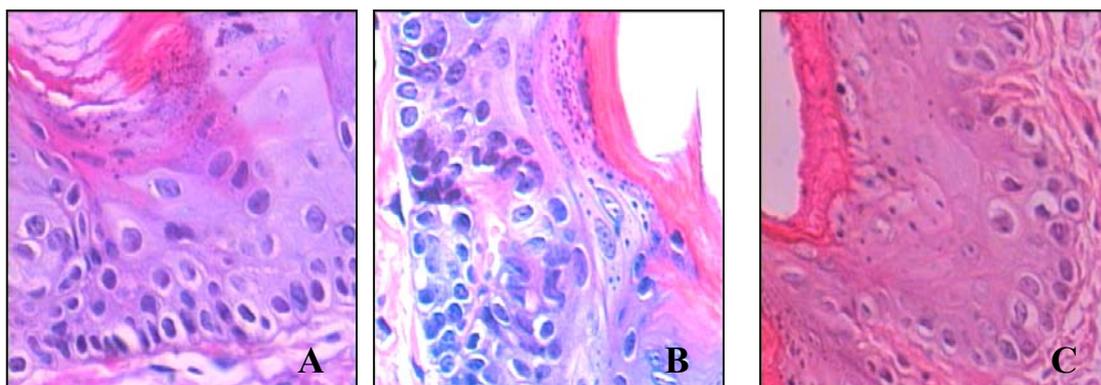


Figura 8. Fotomicrografias utilizadas para o cálculo da relação núcleo citoplasma no Grupo Álcool Contínuo: (A) inicial, (B) 6 meses e (C) 12 meses. HE, 400X

Tabela 18. Comparação da relação núcleo-citoplasma, entre os tempos, no grupo álcool tóxico

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	0,50	0,12	95,77	0,09
Biópsia 6 meses	0,45	0,12	78,62	
Biópsia 12 meses	0,52	0,19	97,12	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a relação para o grupo estudado, nos momentos estudados, mas observa-se que a relação sofreu uma redução entre o momento inicial e o dos 6 meses, voltando a elevar-se entre os 6 e os 12 meses do experimento.

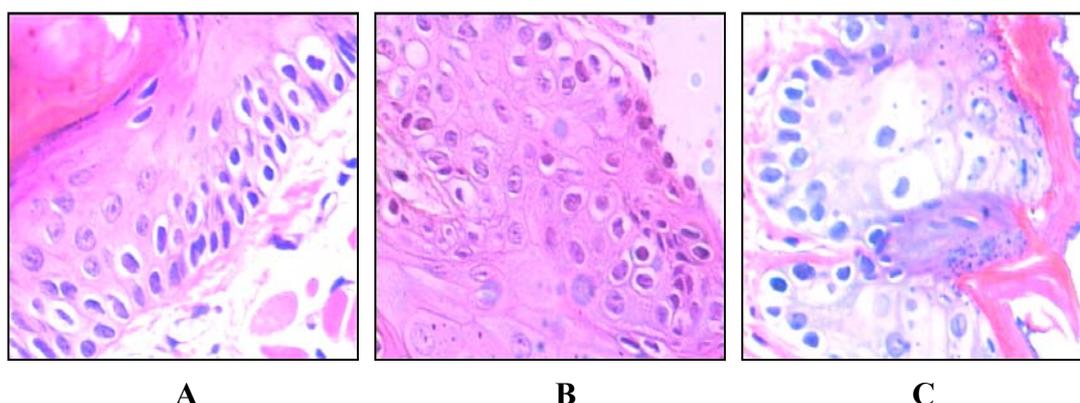


Figura 9. Fotomicrografias utilizadas para o cálculo da relação núcleo citoplasma no Grupo Álcool Tóxico: (A) inicial, (B) 6 meses e (C) 12 meses. HE, 400X

- ESTUDO DA ESPESSURA DO EPITÉLIO

A mensuração desta espessura do epitélio é entendida por nós como um indicador do índice de proliferação do epitélio ao longo do tempo e foi calculada

através de medições realizadas entre o limite da camada basal e a superfície mais externa da camada de ceratina, sempre de forma perpendicular à camada basal.

Tabela 19. Comparação da espessura do epitélio, entre os grupos, no momento inicial

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	0,10	0,02	33,67	0,15
Álcool Contínuo	0,09	0,02	23,50	
Álcool Tópico	0,09	0,02	28,00	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a espessura do epitélio entre os grupos estudados. É possível observar que não há diferença significativa entre as espessuras entre os grupos estudados no momento inicial.

Tabela 20. Comparação da espessura do epitélio, entre os grupos, no momento 6 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Controle	0,11	0,02	36,55 ^A	0,01
Álcool Contínuo	0,09	0,01	18,06 ^B	
Álcool Tópico	0,10	0,02	26,86 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a espessura do epitélio entre os grupos estudados. Observa-se que o Grupo Controle apresentou valores superiores, o que demonstra haver este grupo sofrido um espessamento do epitélio durante os primeiros 6 meses do experimento. (p=0,01)

Tabela 21. Comparação da espessura do epitélio, entre os grupos, no momento 12 meses.

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	0,12	0,03	30,47 ^A	0,05
Álcool Contínuo	0,10	0,01	20,07 ^B	
Álcool Tópico	0,10	0,02	20,56 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a espessura do epitélio entre os grupos estudados ($p=0,05$). Observa-se que o Grupo Controle apresentou valores superiores. Aqui mais uma vez podemos observar que o Grupo Controle sofreu, novamente, um espessamento do epitélio após os primeiros 6 meses do experimento. Comparando-se os dados da Tabela 21 com os apresentados nas Tabelas 19 e 20 observa-se que os grupos que estiveram expostos ao álcool praticamente não modificaram a espessura do epitélio ao longo do tempo experimental.

Tabela 22. Comparação da espessura do epitélio, entre os tempos, no grupo controle.

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	0,10	0,02	18,65 ^A	0,01
Biópsia 6 meses	0,11	0,02	31,32 ^B	
Biópsia 12 meses	0,12	0,03	36,94 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a espessura do epitélio entre os grupos estudados. Observa-se que a espessura do epitélio foi aumentando com o passar do tempo. ($p=0,01$)

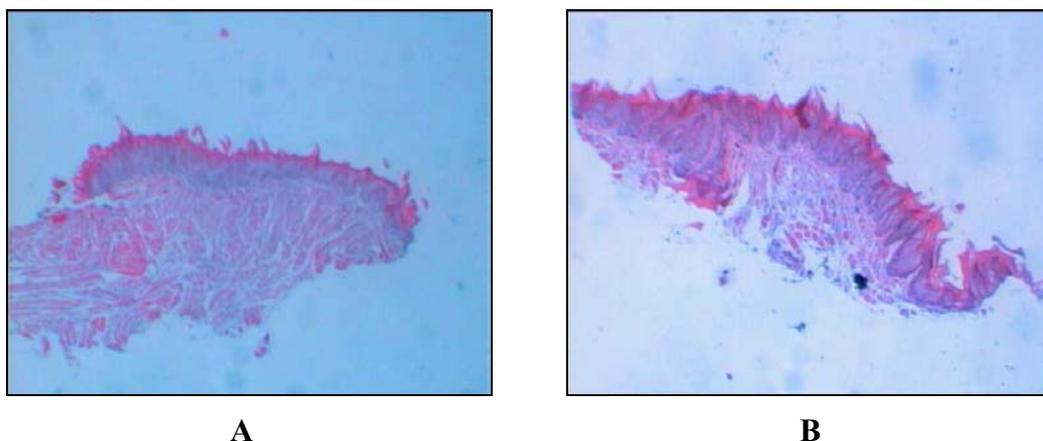


Figura 10. Fotomicrografias utilizadas para o cálculo da espessura do epitélio no Grupo Controle: (A) inicial e (B) 12 meses. HE, 250X

Tabela 23. Comparação da espessura do epitélio, entre os tempos, no grupo álcool contínuo.

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	0,09	0,01	20,82 ^A	0,01
Biópsia 6 meses	0,09	0,01	22,09 ^A	
Biópsia 12 meses	0,10	0,01	36,00 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, observa-se que o valor da espessura do epitélio, neste grupo, praticamente não sofreu alterações ao longo do experimento, mas entre os 6 e os 12 meses houve uma variação significativa estatisticamente ($p=0,01$).

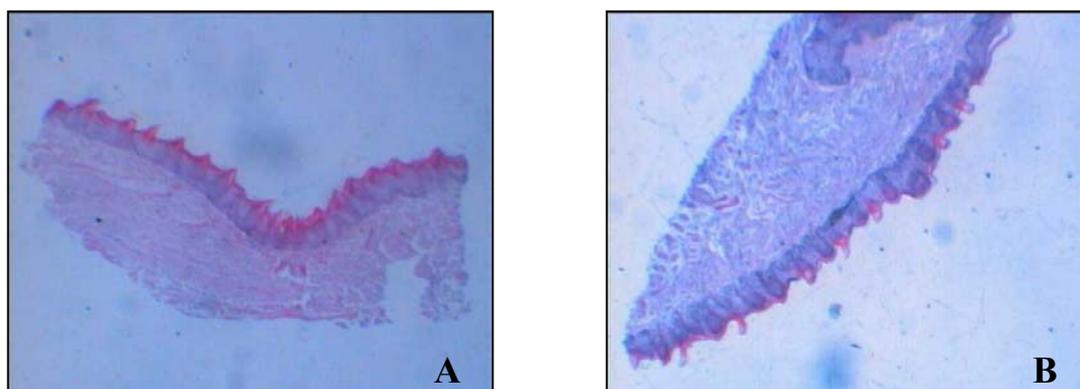


Figura 11. Fotomicrografias utilizadas para o cálculo da espessura do epitélio no Grupo Álcool Contínuo: (A) inicial e (B) 12 meses. HE, 250X

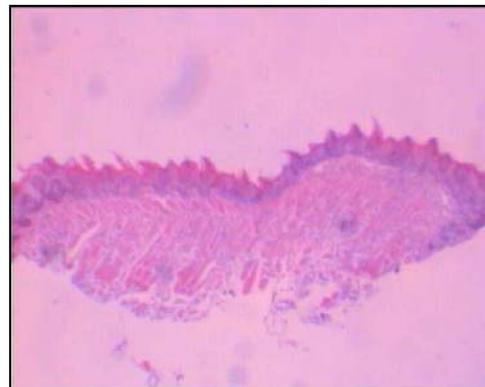
Tabela 24. Comparação da espessura do epitélio, entre os tempos, no grupo álcool tópico.

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	0,09	0,02	20,82	0,18
Biópsia 6 meses	0,10	0,02	27,22	
Biópsia 12 meses	0,10	0,02	30,13	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a espessura do epitélio para os momentos estudados, neste grupo. Pode-se observar que os valores de espessura do epitélio praticamente são os mesmos nos três tempos avaliados.



A



B

Figura 12. Fotomicrografias utilizadas para o cálculo da espessura do epitélio no Grupo Álcool Tópico: (A) inicial e (B) 12 meses. HE, 250X

- ANÁLISE DOS PESOS DOS ANIMAIS ENTRE OS GRUPOS ESTUDADOS

Tabela 25. Comparação dos pesos no Grupo Controle, entre os tempos.

<i>Peso</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Inicial	30,31	2,90	1,06 ^A	0,01*
6 meses	38,11	3,42	1,94 ^B	
12 meses	42,92	3,08	3,00 ^C	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Friedman, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o peso para os momentos estudados. Observa-se que os valores dos pesos dos animais obtidos nos três momentos são progressivamente maiores o que demonstra que os camundongos deste grupo aumentaram de peso ao longo do tempo experimental. (p=0,01)

Tabela 26. Comparação dos pesos no Grupo Álcool Contínuo, entre os tempos.

<i>Peso</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Inicial	32,22	2,52	1,64	0,234
6 meses	33,68	2,88	2,00	
12 meses	35,74	3,52	2,36	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Friedman, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os pesos dos animais para os momentos estudados. Observa-se que os valores de pesos obtidos nos três momentos são sempre diferentes, mas muito próximos, não havendo diferença estatística entre os tempos avaliados no Grupo Álcool Contínuo.

Tabela 27. Comparação dos pesos no Grupo Álcool Tópico, entre os tempos.

<i>Peso</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Inicial	31,25	2,25	1,00 ^A	0,01*
6 meses	36,73	3,03	2,00 ^B	
12 meses	42,75	3,99	3,00 ^C	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Friedman, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os pesos dos animais para os momentos estudados. Observa-se que os valores de pesos obtidos nos três momentos são progressivamente maiores e demonstram haver os camundongos deste grupo engordado ao longo do período experimental. Comparando-se os dados das médias com a Tabela 25 (Grupo Controle) podemos observar que os animais deste grupo aumentaram de peso quase na mesma proporção que os animais do Grupo Controle. (p=0,01)

Tabela 28. Comparação dos pesos no momento de 6 meses, entre os grupos.

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	38,11	3,27	28,82 ^A	0,01*
Álcool Contínuo	33,68	2,85	8,55 ^B	
Álcool Tópico	36,73	3,20	26,53 ^A	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Friedman, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os pesos dos animais para os grupos estudados. Observa-se que os valores de pesos obtidos no período de 6 meses para o grupo Álcool Contínuo apresenta valores inferiores aos outros grupos estudados, o que mostra que os animais dos outros grupos (Controle e Álcool

Tópico) seguiram aumentando de peso, enquanto que os animais do Grupo Álcool Contínuo praticamente mantiveram seu peso do início de período experimental. (p=0,01)

Tabela 29. Comparação dos pesos no momento de 12 meses, entre os grupos.

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	42,92	3,08	34,58 ^A	0,01*
Álcool Contínuo	35,74	3,52	18,00 ^B	
Álcool Tópico	42,75	3,99	27,00 ^A	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Friedman, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre os pesos dos animais para os grupos estudados. Observa-se que os valores de pesos obtidos no período de 12 meses para o grupo Álcool Contínuo apresenta valores inferiores aos outros grupos estudados. Nesta Tabela observa-se o mesmo que já comentamos na Tabela 28. (p=0,01)

- ANÁLISE DOS PESOS DE RAÇÃO CONSUMIDA ENTRE OS GRUPOS

Tabela 30. Comparação dos pesos de ração consumida, consideradas as médias gerais por grupo ao longo dos 12 meses do experimento.

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>p</i>
Controle	481,77 ^{AB}	112,05	0,03*
Álcool Contínuo	441,72 ^A	135,67	
Álcool Tópico	507,92 ^B	109,11	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste Análise de Variância (ANOVA), foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o peso de ração consumida para

os grupos estudados. Observa-se que o peso médio de ração do grupo Álcool Contínuo foi inferior ao peso médio do grupo Álcool Tópico. O grupo Controle não apresentou diferenças significativas em relação aos outros grupos. ($p=0,03$)

- ANÁLISE DA QUANTIDADE DE BEBIDA CONSUMIDA ENTRE OS GRUPOS

Tabela 31. Comparação entre os volumes de bebida consumidos, consideradas as médias durante o período de 12 meses do experimento, por grupo.

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>p</i>
Controle	311,59 ^A	17,13	0,01*
Álcool Contínuo	148,32 ^B	20,68	
Álcool Tópico	303,49 ^A	15,45	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a quantidade de bebida consumida para os grupos estudados. Observa-se que a quantidade consumida pelo grupo Álcool Contínuo foi inferior quando comparado aos outros grupos. ($p=0,01$)

DISCUSSÃO

Buscando-se avaliar os efeitos do consumo contínuo e eventual de álcool a 40°GL sobre a mucosa lingual de camundongos durante um período de 12 meses de exposição, foram controladas as quantidades de ração e bebida, em gramas e mililitros, respectivamente, consumidas pelos grupos durante o tempo total do experimento. Também fez-se o controle mensal do peso dos animais de todos os grupos. Das biópsias realizadas avaliou-se, através da análise de cortes histológicos, o epitélio do dorso da língua observando-se e calculando-se para cada grupo, os seguintes itens: a) Relação entre o comprimento da camada basal e superficial do epitélio; b) Espessura da camada de ceratina; c) Relação núcleo-citoplasma; d) Espessura do epitélio.

O álcool a 40°GL foi utilizado neste trabalho por ser esta a graduação alcoólica média das aguardentes à venda em nosso comércio e também por estar próximo à graduação alcoólica de bebidas como o uísque e a vodka. A graduação °GL não é mais utilizada desde 1975 (ATHANÉ, 2000), foi substituída pelo sistema de alcoometria do INPM (no Brasil) que representa a graduação em percentual (%), mas ainda é utilizada em produtos como aguardentes e vinhos.

Durante o período experimental alguns animais – de todos os grupos - foram a óbito e ao final do experimento o grupo álcool contínuo e o grupo álcool tópico eram os grupos com maior número de indivíduos vivos.

Foi possível observar, embora não tenham sido feitas análises específicas, a mudança na aparência da pelagem dos animais do grupo álcool contínuo, bem como

o seu crescimento corporal. Estes animais não cresceram como os dos demais grupos e apresentaram uma pelagem mais rala com o passar do tempo.

Alguns autores afirmam que não se pôde ainda demonstrar que o álcool isoladamente, em experimentos laboratoriais, atua como um agente carcinogênico, mas reconhecem que as bebidas alcoólicas são apontadas como um importante fator etiológico no desenvolvimento do câncer bucal, mesmo que ainda não se saiba explicar através de qual mecanismo. Estes mesmos autores ressaltam que devemos considerar que algumas bebidas possuem impurezas e/ou contaminantes que poderiam ser ou agir como carcinógenos. Como utilizamos álcool etílico pró-análise 99% e água destilada para a preparação do álcool a 40°GL, podemos afirmar que os resultados encontrados podem ser atribuídos exclusivamente a atuação do álcool sobre o epitélio uma vez que não estivemos expostos ao risco da existência de outras substâncias na mistura (KATO; NOMURA, 1994; OGDEN: WIGHT, 1998 e WIGHT; OGDEN, 1998).

Baseados neste fato podemos embasar o indicativo de MAIER e WEIDAUER (1995), SIMANOWSKI et al. (1995), SLOMIANY et al. (1998) e OGDEN e WIGHT (1998), de que o álcool isoladamente pode ser apontado como um iniciador da carcinogênese pois as alterações celulares que pode causar ou predispor independe do tipo de bebida consumida estando unicamente na dependência da dose/freqüência de ingestão. Nossos resultados demonstraram que o álcool isoladamente foi capaz de promover modificações na morfologia do epitélio lingual e estas alterações possivelmente estão relacionadas à modificações celulares ocorridas. Nossos resultados demonstram que a atuação do álcool independe da freqüência de ingestão

tendo em vista os achados nos grupos que estiveram expostos ao consumo e aplicação tópica do álcool.

Conforme MAIER e WEIDAUER (1995) e informações do INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (2000) os efeitos do álcool se verificam dependendo da frequência de ingestão, da quantidade de alimentos sólidos consumidos e do peso corporal. Pudemos avaliar todos estes itens durante todo o período do experimento e encontramos alterações decorrentes do uso do álcool – grupo álcool contínuo e grupo álcool tópico – independentemente da quantidade de alimentos consumidos e do peso corporal dos animais utilizados neste trabalho. Este fato vem novamente reforçar a idéia de que o álcool de modo isolado pode ser responsabilizado pelas modificações encontradas no epitélio lingual.

SQUIER, COX e HALL (1986) e DU et al. (2000) relatam ser maior o risco para aqueles que ingerem bebidas em baixas concentrações (5%), baseados nos resultados de seus trabalhos experimentais – *in vitro* - onde encontraram um aumento da permeabilidade da mucosa quando utilizaram esta concentração alcoólica. Estes autores discutem a possibilidade de, em uma concentração mais elevada – eles utilizaram 50% de etanol – haver uma fixação do epitélio, fato que dificultaria a penetração do etanol. Ao contrário destes trabalhos, mesmo que neste estudo tenha sido avaliado um sítio diferente (dorso de língua ao invés de assoalho bucal), foram verificadas, por nós, alterações morfológicas utilizando-se a graduação de 40°GL. O fato de termos utilizado um modelo animal e não pesquisa *in vitro* como os autores citados demonstra a importância de estudos *in vivo* onde as condições de ingestão e meio-ambiente bucal podem ser controladas e/ou reproduzidas. A metodologia por nós utilizada por si explica as diferenças encontradas com os autores acima. Do

mesmo modo, poderia se dizer que as concentrações são semelhantes mas não iguais e que talvez a fixação sugerida somente comece a aparecer numa concentração igual ou maior que 50%. Isto indicaria que o álcool pode atuar de diferentes formas sobre o epitélio da mucosa bucal.

Os resultados encontrados por nós indicam o que vários autores já indicavam (BOFFETA et al., 1992; MAIER; WEIDAUER, 1995; SIMANOWSKI et al., 1995; SLOMIANY et al., 1998; OGDEN; WIGHT, 1998; WIGHT; OGDEN, 1998; MAIER et al., 1999): o etanol (álcool etílico) pode ser considerado como o responsável isoladamente pelo aparecimento/desenvolvimento de alterações celulares que podem indicar o início da carcinogênese. Conforme estes autores independentemente do tipo de bebida consumida podemos ter alterações celulares que podem levar ao desenvolvimento de um câncer. Este fato é apoiado por nossos resultados uma vez que pudemos observar alterações morfológicas no epitélio que decorrem de alterações no comportamento das células que o compõe o que indicaria estarem estas sofrendo mudanças que podem, eventualmente, ser relacionadas com o desenvolvimento de um comportamento anômalo.

Nossa metodologia e os resultados obtidos nos levam a crer que os efeitos tóxicos do álcool estão relacionados à sua atuação direta e sistêmica sobre a mucosa bucal, em especial no que diz respeito à proliferação desta. Baseados nos resultados verificados no grupo álcool tópico pudemos constatar que neste grupo houve uma fixação na espessura do epitélio, quando comparado ao grupo controle e ao grupo álcool contínuo (entre os 6 e os 12 meses do experimento). Alguns autores já haviam relatado tais resultados indicando que este não espessamento do epitélio poderia estar

relacionado a uma maior atuação de carcinógenos químicos (KATO; NOMURA, 1994; MAIER et al., 1994; WIGHT; OGDEN, 1998).

Do mesmo modo que MAIER et al. (1999b), que estudaram o efeito do consumo de álcool sobre a mucosa da glote em ratos e OLIVEIRA et al. (1994), que avaliaram o resultado do alcoolismo materno no epitélio lingual de fetos de ratos, encontramos um não crescimento em espessura significativo do epitélio na região estudada (dorso de língua) nos grupos consumidores de álcool e concordamos com as suas conclusões de que esta redução pode significar uma “susceptibilidade maior na direção de uma atuação local de carcinógenos químicos”.

MAIER et al. (1994) concluíram que o álcool, através de seu uso crônico, causa uma atrofia na mucosa bucal, especialmente a da língua, associada a uma proliferação mais intensa posterior, fato corroborado pelo aumento na descamação do epitélio lingual, conforme visto por LARENTIS et al. (2000). Nossos resultados apoiam os de MAIER et al. (1994), pois também encontramos uma atrofia no epitélio da língua representada pela redução na espessura do epitélio conforme verificado nos grupos que estiveram expostos ao consumo contínuo e eventual de álcool. Já no tempo de 6 meses do experimento foi possível constatar-se a redução na espessura do epitélio da língua dos animais dos grupos álcool contínuo e álcool tópico. Aos 12 meses foi verificado que o epitélio manteve-se com espessura menor (Tabelas 21 e 22), nos dois grupos em relação ao controle (GC).

Ao mesmo tempo nossos resultados foram diferentes dos achados de HOMANN et al. (1997) que verificaram hiperplasia e hiperproliferação do trato gastrointestinal superior, incluindo a língua, após administração de aldeído na mucosa bucal por 8 meses. O fato destes autores terem feito uso do aldeído, que é derivado

do metabolismo tecidual do álcool, e referido como um elemento mais tóxico do que o acetaldeído que é o primeiro estágio da metabolização do álcool no fígado pode explicar esta diferença com o presente trabalho. Talvez por termos utilizado o álcool na graduação de 40°GL não tenhamos observado hiperplasia nem hiperproliferação em função da atuação e metabolismo deste ser diferente da do aldeído. Dessa forma pudemos verificar que o álcool não promoveu o espessamento do epitélio da mucosa, tanto na espessura do epitélio quanto na espessura da camada de ceratina naquele grupo que recebeu o álcool em aplicações tópicas.

WIGHT e OGDEN (1998) afirmam ser impossível avaliar-se o papel do álcool na carcinogênese, em humanos, por não se poder medir com precisão a quantidade e o tipo de bebida consumida, assim como os itens da dieta alimentar. Ao utilizarmos um modelo animal pudemos avaliar a atuação do álcool em alterações morfológicas do epitélio lingual através da análise dos controles realizados, pois através da metodologia empregada pudemos quantificar com precisão o volume de álcool ingerido, o tipo e a concentração utilizada, assim como dispomos de dados à respeito da dieta e o controle da evolução do peso dos animais.

SIMANOWSKI et al. (1995), após análise morfométrica encontraram aumento no tamanho dos núcleos das células basais da mucosa bucal, e nós encontramos aumento na relação núcleo-citoplasma nos grupos controle e álcool contínuo no período de 12 meses, no grupo álcool tópico a variação não foi significativa. Talvez fosse necessário prolongar-se o tempo de análise com este grupo. Mais estudos são necessários para que se possa elucidar este evento.

Nossos resultados são comparáveis aos de OGDEN, WIGHT e RICE (1999) quando avaliados os resultados da relação núcleo-citoplasma no tempo de 06 meses

do experimento, quando também encontramos uma significativa redução desta relação nos grupos consumidores de álcool (grupo álcool contínuo e grupo álcool tópico) comparados ao grupo controle. ao final do experimento (12 meses) é o grupo controle que apresenta a maior relação comparado aos demais grupos. Da mesma forma outros estudos são necessários para se identificar o fator que interferiria na maior atividade nuclear observado nos primeiros 06 meses e menor nos 12 meses nos grupos experimentais.

Não encontramos na literatura consultada qualquer referência quanto à relação entre a camada basal e superficial do epitélio. Este item foi avaliado por nós pois o entendemos como um possível indicador de proliferação. Se a camada basal é maior em comprimento que a camada superficial indica que existe uma grande área de proliferação com menor área de descamação e isto poderia ser um indicativo de atividade celular no sentido da proliferação. Nossos resultados mostram que apenas no grupo álcool tópico houve uma variação significativa durante o período experimental (Tabela 6), mostrando um aumento da relação entre as camadas basal e superficial durante o decorrer do trabalho. Este resultado foi interpretado como sendo o efeito de um maior tempo de permanência do álcool na cavidade bucal destes animais e também o fato de que estes animais recebiam um volume maior de álcool durante as aplicações tópicas do que aquele que era consumido *per capita* no grupo álcool contínuo.

Quanto à espessura da camada de ceratina é suposição que a análise da mesma pode ter quase que o mesmo significado da avaliação da espessura do epitélio, uma vez que a camada de ceratina foi considerada nas medições realizadas para a determinação desta. Na análise dos resultados entre os grupos (Tabelas 7 a 9)

é possível verificar que diferenças foram vistas apenas nos grupos expostos ao álcool, mostrando uma redução da espessura de ceratina nos tempos de 6 e 12 meses. Quando se analisa esta medida dentro dos grupos observa-se que no grupo controle (Tabela 10) houve um aumento gradual desta espessura com o passar do tempo, o que pode ser interpretado como o comportamento normal e fisiológico. Já, no grupo álcool contínuo (Tabela 11), não se observa variação ao longo do tempo, fato esse que atribuímos ao efeito do consumo continuado do álcool que teria atuado sobre o epitélio como um agente agressor e, como meio de defesa, este epitélio diminuiu a espessura da camada de ceratina. É possível especular que este fato poderia estar relacionado a um aumento no seu índice de descamação.

No grupo álcool tópico (Tabela 12) pode-se também observar uma redução na espessura da camada de ceratina, mas esta é muito mais acentuada com o passar do tempo do que a que apresentou o grupo álcool contínuo. Neste caso também especula-se se este resultado tenha se dado como uma adaptação à agressão exercida pelo álcool, mas devemos observar que no tempo de 12 meses a espessura neste grupo é bem menor que no grupo álcool contínuo. Mais uma vez é entendido que este resultado decorre do maior tempo de permanência do álcool na cavidade bucal dos animais durante as aplicações tópicas, bem como do volume recebido a cada vez, quando comparados ao grupo álcool contínuo.

CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos podemos concluir que:

- O álcool na graduação de 40°GL consumido de forma contínua ou em aplicações tópicas foi capaz de promover alterações morfológicas no epitélio do dorso da língua conforme os itens avaliados:

- **Relação entre a Camada Basal e Superficial do Epitélio:** verificou-se um aumento desta relação no grupo álcool tópico no tempo de 12 meses;
- **Espessura da Camada de Ceratina:** constatou-se diminuição desta nos grupos expostos ao álcool no tempo de 06 e 12 meses, tendo sido maior a redução no grupo álcool tópico ao final dos 12 meses do experimento. No grupo controle observou-se o aumento na espessura desta camada ao longo do tempo, enquanto que no grupo álcool contínuo não observou-se variação significativa na espessura desde o momento inicial até o final do experimento. No grupo álcool tópico houve uma redução significativa entre a biópsia inicial e a final, não tendo sido significativa entre a inicial e a dos 06 meses;
- **Relação Núcleo-Citoplasma:** verificou-se um aumento desta relação no tempo de 06 meses no grupo controle quando comparado com os grupos experimentais. Quando avaliamos a relação dentro dos grupos entre os tempos observou-se um aumento nesta relação no grupo controle e grupo álcool contínuo apenas;
- **Espessura do Epitélio:** Foi verificada uma ausência de crescimento nesta medida no grupo álcool tópico no tempo de 06 e 12 meses e no grupo

álcool contínuo entre o momento inicial e os 6 meses, quando comparados ao grupo controle. O grupo controle apresentou aumento da espessura enquanto o grupo álcool contínuo e o grupo álcool tópico praticamente não modificaram a espessura do epitélio com o passar do tempo.

SUMMARY

Alcohol, itself was never pointed as a carcinogen. Literature refers to alcohol as a inductor or an element that would act in synergy with the tobacco in oral cancer development. In order to evaluate the alcohol role in oral mucosa changes, an experiment with 60 mice divided in three groups – Control, Continuous Alcohol and Topic Application Group – during one year period was accomplished. Animals of all groups were feed with standard rat pellets. The rats from Alcohol Continuos Group have received alcohol 40°GL as a liquid diet. Topic Group received water and an application of alcohol 40°GL twice a week simulating eventual consumption. Samples from tongue dorsum were obtained at the beginning of the experiment and after every six months. The samples were processed for histological analysis. It was evaluated and measured changes in the epithelium (epithelium thickness, keratin layer thickness, relationship between epithelium basal cells and superficial layer and relationship of nucleus cytoplasm length (basal and intermediary layer)). Through out statistical analysis significant changes was found in almost all evaluated items. It was concluded that alcohol could be pointed out as an oral mucosa morphology-changing agent when consumed continuously or topically applied.

Keywords: Alcohol, tongue morphology, oral mucosa, mount alcohol effects

BIBLIOGRAFIA

* APRESENTAÇÃO DE ACORDO COM AS NORMAS SEGUIDAS PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.

ABNT EB-121 *Álcool – Especificação e Método de Ensaio*, 1960, 5 pág.

ABNT MB-239 *Modo de Execução de Ensaios com Álcool*, 1957, 9 pág.

ABNT NBR 5992 *Determinação da Massa Específica e do Teor Alcoólico do Álcool Etilico e suas Misturas com Água – Método de Ensaio*, março de 1980, 31 pág.

ABNT NBR 5995 *Densímetro para Álcool e suas Misturas com Água – Características – Padronização*, dezembro de 1983, 7 pág.

AGUIAR, M.S.F.; ARAÚJO, V.C. p53 protein expression in lining epithelium adjacent to oral squamous cell carcinoma, *Revista da Pós-Graduação Faculdade de Odontologia UFMG*, v. 4, n. 1, p. 14-19, 1997

ALBERTS, B. et al. Câncer. In: *Biologia Molecular da Célula*. São Paulo: Editora Artes Médicas, 1997. 1362 p., p. 1255-1291

ATHANÉ, B. (biml@oiml.org) *Graduação Alcoólica de Gay-Lussac*. E-mail para sanfelic@ufrgs.br [mensagem capturada em 06.jul.2000]

BAKER, J.F. *A review of the importance of the p53 gene in Cancer Research*. [online] Disponível em <http://www.aye.net/~jfbaker/p53.html> [capturado em 11. jun. 2000]

BOFFETA, P. et al. Carcinogenic Effect of Tobacco Smoking and Alcohol Drinking on Anatomic Sites of the Oral Cavity and Oropharynx. *International Journal of Cancer*, v. 52, n.4, p.530-533, 1992

BORN, I.A. et al. Effects of Chronic Alcohol Drinking on Mouth Mucosa. A Morphometric Study. *Laryngorhinootologie*, v.75, n.12, p.754-8, 1996

DAY, G.L.; BLOT, W.J. Second Primary Tumors in Patients with Oral Cancer. *Cancer*, v. 70, n. 1, p. 14-9, 1992

DELEYIANNIS, F.W. et al. Alcoholism: Independent Predictor of Survival in Patients with Head and Neck Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 88, n.8, p.542-549, 1996

DU, X. et al. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) Across Oral Mucosa in the Presence of Ethanol and Nicotine. *Journal of Oral Pathology Medical*, v. 29, n. 2, p. 80-85, 2000.

FAWCETT, D.W. Oral cavity and associated glands. In: _____ . *A text book of histology*. 12^aed. New York: Chapman & Hall, 1994. 964 p. cap. 2 p.559-577

FRANCO, E. L. F. Epidemiology of cancers of the upper respiratory and digestive system. *Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço*, v. 11, n. 1/3, p.23-33, jan./dez. 1987

GOLDIM, J. R. *Pesquisa em Saúde: Leis, Normas e Diretrizes* 3.ed. Porto Alegre:GSIS/HCPA, 1997. 156p.

HOMMAN, N. et al. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. *Journal of the National Cancer Institute*, Cary, v. 89, p. 1692-1697, 1997.

HUNG, J.; ANDERSON, R. p53: functions, mutations and sarcomas *Acta Orthop Scandinavia Supplement*, n. 273, p. 68-73, 1997

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Alcoolismo Consumo e Relação com o Câncer, Disponível em <http://www.inca.org.br/cancer> [capturado em 11. Jun. 2000]

KATO, I.; NOMURA, A.M.Y. Alcohol in the Aetiology of Upper Aerodigestive Tract Cancer. *Oral Oncology, European Journal of Cancer*, Oxford, v.30B, n.2, p.75-81, 1994.

KUYAMA, K.; YAMAMOTO, H. A study of effects of mouthwash on the human oral mucosae: With special references to sites, sex differences and smoking *Journal of Nihon University School of Dentistry*, vol. 39, n. 4, p. 202-210, 1997

KRUPALA, J.L.; GIANOLI, G.J. Carcinoma of the Oral Tongue. *Journal La State Medical Society*, v. 145, n. 10, p. 421-2, 425-6, 1993

LARENTIS, C.L. et al. Avaliação citopatológica da mucosa bucal de camundongos fêmeas submetidos ao consumo e aplicação tópica de álcool In: XII SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2000, Porto Alegre. Anais

MACLUSKEY, M. et al. The Association Between Epithelial Proliferation and Disease Progression in the Oral Mucosa, *Oral Oncology*, v. 35, p. 409-414, 1999

MAIER, H. et al. Effect of Chronic Alcohol Consumption on the Morphology of the Oral Mucosa. *Alcohol Clinical Experimental Research*, v. 18, n.2, p. 387-391, 1994

MAIER, H.; WEIDAUER, H. Alcohol Drinking and Tobacco Smoking are the Chief Risk Factors for ENT Tumors. Increased Incidence of Mouth Cavity, Pharyngeal and Laryngeal Carcinomas. *Fortschr Medical*, v.113, n.11, p.157-160, 1995

MAIER, H. et al. Alcohol Drinking and Cancer of the Upper Aerodigestive Tract in Women. *Doutsche Medical Wochenschr*, v. 124, n. 28-29, p. 851-4, 1999a

MAIER, H. et al. An Association of Chronic Alcohol Consumption with Morphological Alterations of the Laryngeal Mucosa in Rats. *European Archives of Otorhinolaryngology*, v.256, n. 5, p. 247-9, 1999b

MIKAMI, K.; HASEBA, T.; OHNO, Y. Ethanol Induces Transient Arrest of Cell Division (G₂ + M Block) Followed by G₀/G₁ Block: Dose Effects of Short- and Longer-term Ethanol Exposure on Cell Cycle and Cell Functions. *Alcohol & Alcoholism*, v. 32, n.2, p.145-152, 1997

OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J. Aetiology of Oral Cancer: Alcohol. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 36, n. 4, p. 247-251, 1998

OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J.; COWPE, J.G. Quantitative Oral Exfoliative Cytology. Effect of Alcohol on Normal Buccal Mucosa. *Analyse Quantitative Cytology Histology*, v. 21, n. 2, p. 126-130, 1999

OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J.; RICE, P. Effect of Alcohol on the Oral Mucosa Assessed by Quantitative Cytophotometry. *Journal of Oral Pathology Medical*, v. 28, n. 5, p. 216-20, 1999

OLIVEIRA, C. et al. Efeitos da Injeção Materna de Aguardente de Cana no Epitélio Lingual do Feto de Ratos. *Revista da Faculdade de Odontologia da USP Ribeirão Preto*, v.6, n.7, p.31-35, 1994

RIVERO-ROSAS, H.; JULIAN-SANCHEZ, A.; PIÑA, E. Enzymology of Ethanol and Acetaldehyde Metabolism in Mammals. *Archives of Medical Research*, Mexico City, v.28, n.4, p.453-471, 1997.

ROSS, M.H.; ROWELL, L.J. Capítulo In: _____ *Histologia texto e atlas*. 2^aed. São Paulo: Panamericana, 1993. 779p. cap. 15 p.379-384

RUOSLAHTI, E. How Cancer Spreads, *Scientific American*, 1996 Sep, p. 42-47

SIMANOWSKI, U.A. et al. Effect of Alcohol on Gastrointestinal Cell Regeneration as a Possible Mechanism in Alcohol-associated Carcinogenesis. *Alcohol*, v. 12, n. 2, p. 111-5, 1995

SLOMIANY et al. Induction of Buccal Mucosal Apoptosis with Chronic Alcohol Ingestion. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v.44, n.2, p.381-389, 1998

SQUIER, C.A.; HILL, M.V. Oral Mucosa In: TEN CATE, A.R. *Oral Histology – Development, Structure and Function*. St. Louis: Mosby, 1994, 532 p. cap. 18 p.389-431

SQUIER, C.A.; COX, P.; HALL, B.K. Enhanced Penetration of Nitrosornicotine Across Oral Mucosa in the Presence of Ethanol. *Journal of Oral Pathology*, v. 15, n. 5, p. 276-279

WANNMACHER, C.M.D; DIAS, R.D. Relações entre os constituintes químicos e o meio intracelular – I - Solubilidade e detergência. In: _____
Bioquímica fundamental. 5ªed. Porto Alegre: UFRGS 1979. 499 p. cap. 5 p.55

WEINBERG, R.A. How Cancer Arises. *Scientific American*, 1996 Sep, p.32-40

WIGHT, A.J.; OGDEN, G.R. Possible Mechanisms by Which Alcohol may Influence the Development of Oral Cancer – A Review. *Oral Oncology*, v. 34, n. 6, p. 441-7, 1998