

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PCNA NO EPITÉLIO LINGUAL DE
CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À INGESTÃO E APLICAÇÃO TÓPICA DE
ÁLCOOL A 40°GL.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Odontologia
na área de Patologia bucal

FÁBIO LUIZ DAL MORO MAITO

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

Porto Alegre, Julho de 2001

Aos meus pais e irmãos, que por mim, não mediram
qualquer esforço, dedico esta Dissertação.

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que colaboraram para que esse trabalho fosse possível.

Em especial aos meus pais Darci e Geni e irmãos Léo, Lina, Elias e Ana Maria pelo incentivo e privações que passaram desde os tempos da graduação para proporcionar o meu crescimento. À tia Selina pelo apoio intelectual e logístico.

À Elisiane que sempre me apoiou e compreendeu minha ausência no decorrer do curso.

Aos professores do Curso de Mestrado em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRGS; J.J. Barbachan, Onofre F. de Quadros, Pantelis V. Rados e em especial ao meu orientador Manoel Sant’Ana Filho, que me ensinaram não só Patologia, mas também o respeito, amizade e a responsabilidade que temos que ter em equipe e na vida.

À Isabel que esteve sempre pronta para ajudar nas minhas constantes “falta de tempo” para cumprir os plantões de laboratório, além de sua competência na realização da parte laboratorial deste trabalho.

Aos meus colegas de Mestrado Christinne, Clélea, Tatiana e Júlio, este que foi parceiro no trabalho experimental, agradeço pela amizade desenvolvida nesses dois anos.

Aos alunos Luhana, Carla, César, Cláudia e os internos na Patologia, Paula, Ana Luísa e Vinícius, todos foram essenciais no auxílio com o experimento.

À Capes, por financiar parte dos meus estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ÍNDICE DE TABELAS e FIGURA	6
1- INTRODUÇÃO	7
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	9
3- PROPOSIÇÃO	21
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
5- RESULTADOS e DISCUSSÃO	27
6- CONCLUSÕES	35
SUMMARY	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS	41
Anexo I – Técnica imunohistoquímica para a evidenciação do PCNA.....	41
Anexo II – Análise Estatística.....	43

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o efeito da ação local e sistêmica do álcool na proliferação celular, realizou-se um experimento com sessenta camundongos divididos em três grupos de vinte, durante um ano. Um grupo ingeria álcool a 40°GL (Gradação Alcoólica de Gay-Lussac) em substituição à água durante todo o período do experimento, outro grupo recebia aplicações tópicas de álcool a 40°GL no dorso da língua duas vezes por semana e o terceiro grupo foi o controle. A quantificação da proliferação celular considerou as células positivas para a evidenciação do PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular), pela técnica imunohistoquímica. Foram consideradas as células das camadas basal e intermediária do epitélio lingual. A contagem foi realizada em três momentos do trabalho; antes dos animais serem submetidos ao álcool a 40°GL, aos seis e aos doze meses, fazendo comparações entre os grupos e intra grupos. Nos resultados observou-se que aos doze meses de experimento, houve aumento da proliferação celular na camada intermediária no epitélio do grupo que ingeria álcool continuamente ($p = 0,01$). Os grupos controle e de aplicação tópica não mostraram diferenças significativas na proliferação celular em momento algum do trabalho. Com isso, concluiu-se que o efeito do álcool na promoção da proliferação celular, neste experimento, é devido a sua ingestão contínua e acontece em períodos acima de 6 meses.

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURA

TABELA 01 – Comparação entre os momentos da contagem de células PCNA negativas da camada intermediária no grupo Controle.....	28
TABELA 02 – Comparação entre os momentos da contagem de células PCNA negativas da camada intermediária no grupo Álcool Contínuo	28
TABELA 03 – Comparação entre os grupos da contagem total de células PCNA positivas no momento 12 meses.....	30
TABELA 04 – Comparação dos momentos da contagem de células Positivas no grupo Controle	31
TABELA 05 - Comparação entre os grupos da contagem de células PCNA positivas na camada intermediária no momento 12 meses	32
FIGURA 01 - Fotomicrografia do epitélio lingual de camundongo. Espécime submetido a técnica de imunohistoquímica da evidenciação do PCNA.....	24

1- INTRODUÇÃO

O consumo crônico de álcool é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço. Entretanto, o efeito do álcool na mucosa bucal e sua associação com o desenvolvimento do câncer em humanos é difícil de se estabelecer, pois frequentemente está relacionado com o uso de tabaco, OGDEN; WIGHT (1998). Trabalhos experimentais verificaram que um dos efeitos do álcool no trato digestivo superior é o aumento da proliferação celular, o que poderia contribuir para o desenvolvimento de neoplasias, pois a estimulação da regeneração celular geralmente aumenta a carcinogênese SIMANOWSKI et al.(1995).

Contudo, há ainda a dúvida, se o álcool produz seus efeitos topicamente na cavidade bucal produzindo mudanças epiteliais, ou se o álcool age sistemicamente, via sistema imune, fígado, ou alterações no metabolismo das vitaminas, WRIGHT; BINNIE (1988). Além destes fatos o próprio envelhecimento pode ter papel na proliferação celular, o que poderia favorecer o aparecimento de neoplasias.

Com a intenção de responder as dúvidas acima e saber mais sobre o real efeito do álcool, surgiu a idéia de quantificar a proliferação celular do epitélio lingual de camundongos submetidos à ingestão contínua e ação tópica local do álcool, relacionando com o envelhecimento dos mesmos. Para a análise das variáveis foi feito

um estudo longitudinal com a quantificação da proliferação celular pela técnica imunohistoquímica do PCNA, (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) que pode ser feita com material emblocado em parafina.

2- REVISÃO DA LITERATURA

Vários estudos verificaram relação entre o consumo de álcool e o desenvolvimento do câncer bucal. Foram feitas pesquisas em várias partes do mundo com pessoas de culturas diferentes e com variedades de bebidas alcoólicas típicas dos locais estudados e também com bebidas mundialmente consumidas. A maioria dos autores verificou que os pacientes com câncer de boca e aparelho digestivo estavam acima dos 50 anos e a porcentagem de etilistas era maior do que na população em geral, WAHI (1968), SCHMIDT; POPHAM (1981), MASHBERG et al. (1981), RICH; RADDEN(1984).

Foi sugerido um efeito independente para o álcool na etiologia do câncer. E mesmo a despeito da inadequada evidência para a carcinogênese do álcool em trabalhos experimentais, há uma suficiente evidência para o efeito carcinogênico das bebidas alcoólicas na boca, faringe, laringe e esôfago em humanos. Pois pacientes que desenvolveram câncer nesses sítios, consumiam três vezes mais álcool por dia, quando comparados com aqueles que não desenvolveram a doença. O risco aumentou progressivamente com o aumento da quantidade de álcool consumido. E ao contrário, houve uma diminuição da incidência de câncer em grupos de pessoas onde não é permitida a ingestão de bebidas alcoólicas em relação à população em geral, por

exemplo, nos Mormons e Adventistas do Sétimo Dia, TUYNS (1979), KATO e NOMURA (1994).

Dependendo da região estudada, variou o tipo de bebida considerada de maior risco para o desenvolvimento de câncer. Em 1998 STEFANI et al. em um estudo no Uruguai observaram que bebidas destiladas puras estavam mais associadas ao câncer de boca e faringe do que o vinho. Já em 1999, FIORETTI et al. realizaram um estudo na Itália, constatando que vinho e cerveja eram as bebidas que ofereciam maior risco para o desenvolvimento de câncer de boca e faringe.

Apesar das evidências epidemiológicas encontradas relacionando álcool e câncer, não se sabe ao certo o seu real efeito e mecanismo de ação, pois a maioria dos pacientes que desenvolvem câncer de cabeça e pescoço são tabagistas e etilistas simultaneamente e com frequência ingerem vários tipos de bebidas, não sendo possível separar totalmente os efeitos do tabaco e do álcool, MASHBERG et al. (1981); RICH e RADEN (1984), SQUIER et al. (1986); ZHENG. et al (1997).

Outras dificuldades foram encontradas para avaliar o papel do álcool no desenvolvimento do câncer; como a subjetividade e a falta de veracidade das informações sobre o consumo alcoólico dos pacientes, a falta de padronização nas dosagens de álcool ingerido em que várias medidas foram usadas, por exemplo: unidades, gramas, onças, “drink” e equivalentes de uísque, BRUGERE et al.(1986);

JOVANOVIC et al.(1993); ZHENG et al.(1997); OGDEN,WIGHT (1998); STEFANI et al.(1998); FIORETTI et al. (1999).

A teoria que predomina entre os autores é que há um efeito sinérgico multiplicativo entre o álcool e tabaco para o desenvolvimento de câncer. Estudos mostram que usuários de tabaco e álcool tem sido vítimas de câncer 15 anos antes do que aqueles que não os usam, JOHNSON (1991); WIGHT, OGDEN (1998).

Fatores genéticos e componentes ambientais, alguns vírus, certos agentes físicos e substâncias químicas variadas tem papel decisivo no aparecimento de vários tumores humanos e de animais. Os tumores são entendidos hoje como resultado de agressões ambientais em um indivíduo geneticamente suscetível e eles se desenvolvem em dois estágios: iniciação e promoção. A iniciação é a transformação celular, ou seja, as mudanças induzidas por cancerígenos físicos, químicos ou biológicos que causam alterações genéticas nas células e alteram suas respostas ao microambiente, tornando-as potencialmente capazes de se multiplicar de modo autônomo. Uma célula iniciada torna-se menos responsiva a fatores que inibem o crescimento celular, a indutores de diferenciação celular ou à morte programada. Como a ação do iniciador é irreversível, admite-se que atue provocando alterações permanentes no DNA (Ácido Desoxirribonucléico). Todavia, uma célula iniciada não origina tumor. A promoção é a proliferação ou expansão clonal das células iniciadas, que é um fenômeno indispensável para a fixação da alteração genética e para o crescimento da neoplasia. O

avanço do câncer com modificações biológicas, que em geral torna-o cada vez mais agressivo e maligno chama-se progressão tumoral. Além disso, a multiplicação celular aumenta a probabilidade de novas alterações genéticas. Os agentes promotores atuam pelo tempo de exposição e pela intensidade das reações teciduais que provocam, têm em comum a propriedade de irritar os tecidos e provocar reações inflamatórias e proliferativas, BRASILEIRO FILHO, G. et al. (1994).

Não há nenhum trabalho confirmando que o álcool isoladamente provoque tumores. Estudos indicam que ele é um promotor de neoplasia, impedindo a reparação do DNA e não teria isoladamente efeito clastogênico (alterações nas cromátides). A resposta normal ao dano do DNA, na fase G2 da mitose, é o aumento do tempo nessa fase para possibilitar a reparação, o que estaria prejudicado pela presença do álcool, PARISE Jr. (2000).

O consumo de álcool está vinculado ao aumento do risco para o câncer de boca, faringe, laringe, esôfago e fígado. A administração aguda ou crônica de álcool induz mudanças em todos os níveis da organização biológica, percorrendo os níveis moleculares e comportamentais, FREUND (1979).

Alguns possíveis mecanismos co-carcinogênicos do etanol têm sido estudados. Poderia haver uma mudança no metabolismo hepático e / ou distribuição dos carcinógenos; interferência no sistema que repara as alquilações do DNA induzidas por

carcinógenos; dano direto na mucosa com consecutiva estimulação da regeneração celular; mal nutrição mediada pelo álcool. Além disso, a produção de acetaldeído e radicais livres via citocromo P450 e via enzima álcool desidrogenase no trato digestivo superior pode induzir a um dano no tecido e uma secundária hiper-regeneração, THERAPONDOS et al. (1999).

Resultados de pesquisas sugerem que o sinergismo entre tabaco e álcool na etiologia do câncer de boca pode ser explicado, pelo menos em parte, devido aos efeitos permeabilizantes locais do álcool na penetração do carcinógeno específico do tabaco, a Nitrosornicotina (NNN), e de outros também, através da mucosa bucal. Em contato direto com a membrana da célula, o álcool exerceria um efeito na bi-camada fosfolipídica, agindo como solvente, podendo remover algum conteúdo lipídico tornando a mucosa mais permeável, McCOY, WYNDER (1979); SQUIER et al. (1986); DU et al (2000).

SIMANOWSKY et al. (1995) em um artigo de revisão, observaram que numa análise morfométrica de ratos Wistar, alimentados por 6 meses com dieta contendo álcool em 36% do total de calorias ingeridas, houve aumento no tamanho do núcleo das células da camada basal, do assoalho bucal e também ponta e bordas da língua. Além disso a percentagem de células na fase S do ciclo celular foi maior em relação aos que não ingeriam álcool. Foi constatado que a média da espessura epitelial do assoalho bucal foi reduzida nos animais que consumiam álcool em sua dieta. Esses

achados indicam que houve uma atrofia da mucosa nos sítios de maior contato com o álcool, indicando uma maior vulnerabilidade para os carcinógenos.

Por meio de um sistema de perfusão “in vitro”, observou-se que concentrações de etanol acima de 5% e menores que 50% aumentaram a permeabilidade da mucosa bucal à NNN. A concentração de 50% não alterou significativamente a permeabilidade, provavelmente devido ao efeito fixador do álcool. O assoalho bucal foi a região que mostrou maior permeabilidade, representando o sítio bucal de maior risco para o desenvolvimento de câncer em tabagistas e etilistas, SQUIER et al. (1986); DU et al. (2000).

SEITZ et al. em 1990 mostraram que ratos alimentados com dieta contendo álcool em 36% do total das calorias ingeridas, submetidos à aplicação direta no reto do carcinógeno primário acetoximetilmetilnitrosamina (AMMN), tiveram a ocorrência de tumores mais rapidamente do que aqueles que somente receberam o AMMN. Segundo o autor, o álcool poderia acelerar quimicamente a indução da carcinogênese retal pelo mecanismo direto mediado pelo acetaldeído que pode ser produzido por microorganismos fecais, e uma quantidade considerável se ligaria à mucosa, resultando em injúria do tecido manifestada por uma hiper-regeneração, a qual poderia estar a favor da carcinogênese.

Esses trabalhos confirmaram o que McCOY e WYNDER haviam observado em 1979, que na pele de camundongos submetidos à ação de agentes sabidamente genotóxicos, como o dimetilbenzantraceno (DMBA) dissolvido em álcool, houve o desenvolvimento de neoplasia mais precocemente do que quando o DMBA foi dissolvido em acetona. Enfatizando o papel co-carcinogênico do álcool.

McCOY , WYNDER (1979) e WRIGHT et al. (1988) sugeriram também a possibilidade do álcool causar danos no fígado, podendo diminuir sua capacidade de desintoxicação de potenciais carcinógenos. Como consequência da perda da capacidade metabólica do fígado, haveria um aumento da concentração sistêmica de carcinógenos que poderiam agir sobre os tecidos alvos numa proporção maior do que ocorreria em indivíduos sem comprometimento hepático.

O álcool é rapidamente absorvido pela mucosa gástrica e duodenal e metabolizado principalmente no fígado antes de sua eliminação. O metabolismo hepático ocorre em três fases:

1-Oxidação do álcool em acetaldeído, através da enzima álcool desidrogenase (ADH).

2- Conversão do acetaldeído para acetato, catalizado pela enzima aldeído desidrogenase (ALDH).

3- O acetato é oxidado para produzir dióxido de carbono, ácidos graxos e água.

A toxicidade do álcool inclui um espectro de doenças do fígado como: esteatose, hepatite alcoólica aguda, cirrose e hepatocarcinoma que se desenvolve entre 15% e 30% dos pacientes com cirrose. Os riscos de desenvolver doenças hepáticas se correlaciona principalmente com a duração e quantidade do consumo de álcool, THERAPONDOS et al. (1999).

GRAHAM e RENNIE em 1987 verificaram os níveis da enzima Y-glutamil transpeptidase no soro de ratos alimentados com dieta líquida contendo 36% do valor calórico de álcool, por acreditarem ser o melhor marcador para danos no fígado. Os níveis dessa enzima também foram medidos e comparados com ratos considerados controle que ingeriram dieta usual. Esses autores verificaram que os níveis da enzima Y-glutamil transpeptidase foram maiores nos animais submetidos à ingestão da dieta contendo etanol, caracterizando alteração na função hepática.

Trabalhos experimentais tem mostrado que o álcool *per se* não tem poder mutagênico (mudanças em nível de DNA), clastogênico (mudanças nas cromátides) ou carcinogênico. Porém o acetaldeído, o metabólito primário do álcool tem se mostrado mutagênico. OGDEN;WIGHT (1998), WIGHT; OGDEN (1998).

Em 2000, MUTO et al. constataram que o acetaldeído pode ser derivado da enzima álcool desidrogenase (ADH) da mucosa, mas principalmente pela oxidação microbiana do etanol pela microbiota bucal, especialmente das bactérias aeróbicas gram-positivas. O gênero Neisseria tem maior atividade ADH e produz acetaldeído quando cultivada em presença de álcool.

Proliferação celular alterada é uma das características que difere o câncer do tecido normal. Logo, é importante entender a regeneração celular, na mucosa normal, durante a carcinogênese e em carcinomas já instalados, para poder desenvolver e avaliar novas medidas terapêuticas. Nos últimos anos têm-se atentado mais para a biologia molecular, ciclo celular e seus eventos na regulação da proliferação das células, SIMANOWSKY et al. (1995).

MACLUSKEY et al.(1999) estudaram a possível associação entre a proliferação celular evidenciada pela técnica imunohistoquímica do anticorpo Ki-67, que está presente mais intensamente nas fases G2 e M do ciclo celular, e a progressão da doença na mucosa bucal. Analisando espécimes de mucosa normal, displasias e carcinoma espinocelular, verificaram que os índices de proliferação celular aumentaram com a progressão da doença em direção à malignidade, de modo que a mucosa normal teve um índice de proliferação celular menor que a displasia e esta por sua vez, menor que o carcinoma. Apesar dos resultados, o autor questiona a eficiência dos marcadores de proliferação celular na associação com transformação neoplásica, pois comparações

entre displasia epitelial oral e carcinomas têm produzido resultados contraditórios em que alguns estudos encontraram diferença significativa entre esses dois grupos e outros não. Segundo o autor, os resultados conflitantes da literatura são comumente devido às diferenças na metodologia usada, incluindo o marcador empregado para determinar a proliferação.

CHAVES DE OLIVEIRA et al. (2000) analisaram a proliferação celular através da técnica da evidenciação do PCNA em mucosa bucal normal, hiperplásica e atípica, nas camadas basal e intermediária.

Os epitélios normais apresentaram uma percentagem média de 34,62% de células marcadas; os epitélios hiperplásicos de 60,95%; e os atípicos de 86,42%. Em relação às camadas basal e intermediária, nos epitélios normais, observou-se que as células marcadas concentravam-se mais na camada basal; nos epitélios hiperplásicos foram observadas distribuindo-se indiferentemente nas duas camadas; já nas atípicas epiteliais, essas células estavam presentes de forma predominante na camada intermediária. Os resultados sugerem que o número de células PCNA positivas e a localização dessas células, são indicadores de atipia epitelial.

Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), historicamente foi descrito como um auto-anticorpo presente em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, que identificava um antígeno presente nas células em proliferação. Posteriormente foi identificado como PCNA, uma proteína nuclear não histônica de 36

kD envolvida na síntese de DNA. Como uma proteína auxiliar das polimerases delta e epsilon, o PCNA é necessário para a replicação do DNA in vivo e in vitro e tem sido relacionado também com o reparo do DNA. É empregado como marcador de proliferação celular, ainda mais depois do desenvolvimento de anticorpos que funcionam em material fixado em formol e embebido em parafina, ALVES et al. (1999).

SIMANOWSKI et al. em 1994 observaram após 27 biópsias da mucosa retal de pacientes etilistas que consumiam mais de 100 gramas de álcool por dia e de 12 biópsias de pacientes que consumiam menos que 30 gramas de álcool por dia, que houve maior proliferação celular nos primeiros. O aumento da regeneração celular coloretal representa um aumento da suscetibilidade dos tecidos à carcinogênese química e esses dados evidenciam que o estado hiper-proliferativo está associado com o aumento do risco de desenvolver câncer e poderia explicar o efeito co-carcinogênico do álcool no reto.

Segundo SIMANOWSKY et al. (1995), condição proliferativa da mucosa induzida pelo consumo crônico de álcool pode ter uma importante contribuição na carcinogênese, porque a estimulação da regeneração celular geralmente induz a carcinogênese, pois células ativamente proliferantes são mais suscetíveis aos iniciadores da carcinogênese e às alterações genéticas.

Em um trabalho experimental foi medido o índice de proliferação celular (PCNA) no epitélio do esôfago de ratos que ingeriam álcool. A análise foi feita em ratos intactos e em ratos sialoadenectomizados, nesses, a proposta foi reduzir a quantidade de saliva, um importante fator controlador da proliferação celular. Os resultados mostraram aumento da proliferação das células do esôfago em ratos alimentados com dieta contendo álcool, sem a remoção das glândulas. Enquanto que o efeito do álcool em ratos sialoadenectomizados não foi visto. A razão para esse efeito supressor é ainda especulativa, mas parece que o fator de crescimento epitelial (EGF), que se encontra em abundância na saliva, pode estar envolvido. Nesse mesmo trabalho observou-se que o envelhecimento não afeta significativamente a proliferação celular da mucosa do esôfago, SIMANOWSKY et al. (1995).

HOMANN et al em 1997 constataram um aumento da proliferação celular, marcada pela evidenciação do anticorpo Ki-67, nos epitélios da língua, epiglote e esôfago em espécimes retirados após o sacrifício de ratos que ingeriram 120mM de acetaldeído na água durante 8 meses, em relação àqueles animais que ingeriram somente água como fonte de hidratação. Nesse experimento, a língua mostrou um índice proliferativo maior que os outros sítios estudados, fato que segundo o autor, poderia ser devido a produção de acetaldeído pelos microorganismos na saliva. O mesmo concluiu que o acetaldeído administrado via oral em ratos, pode causar alteração hiperproliferativa no epitélio do trato gastrointestinal superior.

3-PROPOSIÇÃO

Diante dos trabalhos que variam na interpretação do real papel do álcool como carcinógeno, da dúvida se produz efeitos devido a sua ingestão contínua ou por sua ação local e acrescentando, que recentes estudos tem colocado o envelhecimento como um fator envolvido na carcinogênese, podendo interferir na proliferação celular, nos propomos a quantificar a proliferação celular através da evidenciação das células PCNA positivas nas camadas basal e intermediária do epitélio lingual de camundongos submetidos à ingestão e aplicação tópica de álcool a 40° GL, em um experimento com 12 meses de duração.

4- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento teve uma duração de 12 meses e foi realizado com 60 camundongos CF1 fêmea com 2 meses de idade, no início do estudo, adquiridos da Divisão de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS) e permaneceram no Biotério desta instituição durante todo o período experimental.

Os animais foram divididos em três grupos de 20 camundongos cada, mantidos em número de 5 em 4 gaiolas plásticas conforme segue:

O 1º grupo foi o Controle, onde os animais foram submetidos a dieta usual *ad libitum*, ração própria para camundongos, marca NUVILAB/CR1 e água.

Ao 2º grupo, denominado Álcool Tópico, acrescentou-se a variável aplicação tópica de álcool a 40°GL na cavidade bucal duas vezes por semana. Essa aplicação se deu com uma seringa de insulina (1 ml), sem agulha, com o animal mantido de cabeça para baixo, evitando a ingestão do álcool. A aplicação do álcool foi de uma só vez, esvaziando toda a seringa, molhando com álcool toda a boca do animal, num tempo aproximado de 3 segundos.

O 3º grupo, denominado Álcool Contínuo, ingeriu a vontade álcool a 40° GL em substituição à água durante todo o experimento e ração marca NUVILAB/CR1.

Foram medidos semanalmente, o volume de água, álcool e a quantidade de alimento ingerido em cada grupo. Uma vez por mês todos os animais foram pesados. Os resultados das medições acima estão apresentados no anexo II.

Antes de submeter os animais à ingestão e às aplicações de álcool, cada camundongo foi analgesiado pela inalação de éter sulfúrico em uma câmara fechada, após foi contido e com a língua tracionada por uma pinça foi realizada uma biópsia incisional em seu dorso com um punch manual de 3 milímetros de diâmetro.

Após 6 e 12 meses foram feitas novas biópsias no mesmo local da primeira, nos 3 grupos, obedecendo sempre a mesma técnica descrita acima.

Todas as peças cirúrgicas foram fixadas em formalina a 10% durante 24 horas e submetidas a técnica para inclusão em parafina. Em seguida foram incluídas seguindo a orientação transversal para que pudéssemos ver toda a estratificação epitelial e conjuntiva. Realizaram-se dois cortes de 3 micrômetros de cada espécime: um corado por Hematoxilina e Eosina (HE) e outro submetido à técnica de imunohistoquímica para a avaliação da expressão do PCNA (Antígeno nuclear de proliferação celular), no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia

da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A descrição da técnica imunohistoquímica segue no anexo I.

A localização dos campos e a quantificação das células marcadas pela expressão do PCNA foram realizadas em um microscópio binocular, num aumento de 400 vezes. A contagem se deu em três campos do epitélio, uma em cada extremidade e outra no centro, evitando cortes transversais das papilas. A avaliação quantitativa da expressão do PCNA foi feita nas camadas basal e intermediária do epitélio de cada campo selecionado, contando todas as células positivas e negativas. Foram consideradas células da camada basal aquelas que estavam em contato com o tecido conjuntivo subjacente e que apresentassem núcleo colunar. Conforme figura 1.

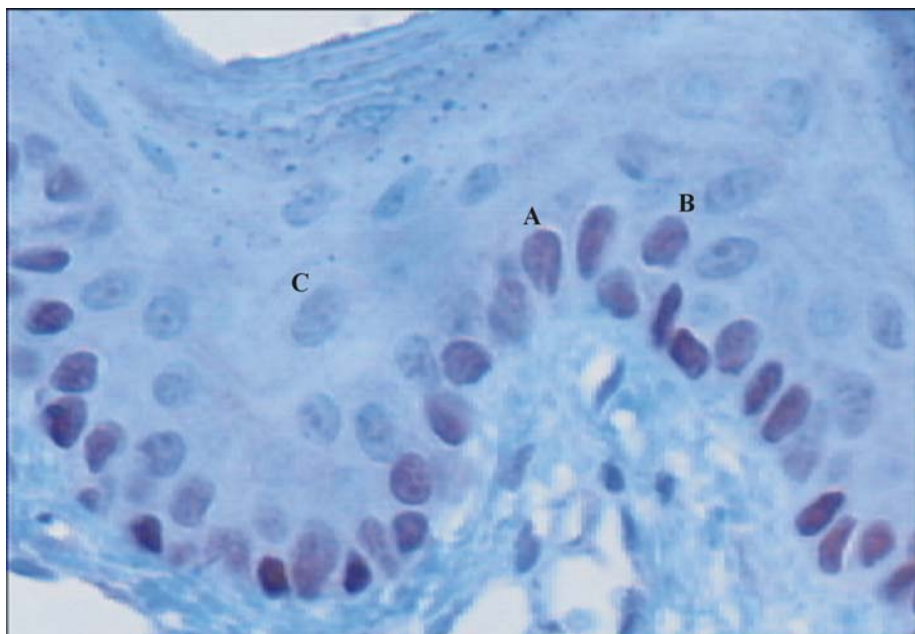


FIGURA 1: Fotomicrografia do epitélio lingual de camundongo. Espécime submetido a técnica de imunohistoquímica da evidenciação do PCNA. (A- Célula da camada basal PCNA positiva; B - Célula da camada intermediária PCNA positiva; C - Célula da camada intermediária PCNA negativa). Aumento 400x.

Para a quantificação dos núcleos marcados com PCNA foi utilizado um microscópio binocular da marca Zeiss-Standard 20, com aumento de 400 vezes, ligado a um programa de computador (IMAGELAB – Sistema de processamento e Análise de Imagem / Softium Sistemas de Informática – São Paulo) que transfere as características do campo microscópico selecionado, através de uma câmera de vídeo, ligada à placa de captura de imagem do computador. Neste programa foi usado o recurso que permite a contagem manual, realizada através do apontamento pela seta do “Mouse” das estruturas a serem contadas na imagem exibida no monitor.

Antes da contagem definitiva foi realizada a calibração com o orientador do trabalho que foi considerado padrão. Para isso, foram selecionados 20 campos aleatoriamente que foram contados primeiramente pelo autor e posteriormente pelo professor orientador, dando um nível de coincidência de 95% para o teste t. ($P=0.05$)

A quantificação foi feita em dois momentos distintos, pela mesma pessoa sem saber a que grupo pertencia a lâmina que estava sendo contada, caracterizando a imparcialidade do estudo. As biópsias, inicial e de seis meses, foram contadas primeiro e por fim a biópsia de doze meses.

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis comparando os dados iniciais, intermediários e finais dos grupos entre si e entre os próprios grupos 1º, 2º e 3º.

Este experimento foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 27/01/2000 e foi aprovado quanto ao método na disciplina de Seminários de Dissertação.

O presente trabalho está de acordo com a Declaração Universal dos Direitos Animais e dos princípios éticos na experimentação animal emitidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, GOLDIM, J.R. (1997).

5 -RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram comparadas nos momentos inicial, seis e doze meses do experimento, o número total de células PCNA positivas e negativas (soma das células das camadas basal e intermediárias), relacionando os grupos entre si e os dados dentro do próprio grupo através do tempo.

A quantificação da expressão do PCNA nas camadas basal e intermediária foi feita separadamente, também comparando-se os dados dos momentos inicial, seis e doze meses dentro do mesmo grupo e entre os grupos.

Dentre todas as análises realizadas, três apresentaram diferenças significativas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, as quais serão apresentadas e discutidas. As comparações que não apresentaram diferenças significativas estão apresentadas no anexo II.

O primeiro resultado observado com significância, foi a diminuição do número de células PCNA negativas na camada intermediária dos grupos Controle e Contínuo na análise feita em seis meses do experimento, em relação a contagem realizada no momento inicial. Conforme tabelas 1 e 2 respectivamente.

Tabela 1. Comparação entre os momentos da contagem de células PCNA negativas da camada intermediária no grupo Controle.

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Biópsia Inicial	45,30	24,63	35,53 ^A	0,01*
Biópsia 6 meses	22,16	8,08	16,58 ^B	
Biópsia 12 meses	35,06	11,83	32,16 ^A	

Tabela 2. Comparação entre os momentos da contagem de células PCNA negativas da camada intermediária no grupo Álcool Contínuo.

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Biópsia Inicial	36,65	14,49	34,97 ^A	0,02*
Biópsia 6 meses	24,40	11,55	20,75 ^B	
Biópsia 12 meses	33,69	16,42	30,09 ^A	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Observa-se que a biópsia realizada no período de 6 meses possui uma contagem de células PCNA negativas inferior nos grupos Controle e Contínuo.

No grupo Álcool Tópico também houve diminuição das células PCNA negativas na biópsia de 6 meses, embora sem diferenças estatísticas significativas.

A diminuição das células PCNA negativas não foi acompanhada pelo aumento das células PCNA positivas, com isso, vimos que as variáveis não tiveram influência no comportamento proliferativo celular no epitélio lingual nos primeiros 6

meses de estudo. Esse fato pode ser explicado, porque sendo 8 meses de vida, correspondente à idade adulta, o tecido epitelial dos camundongos atinge um estado de equilíbrio entre proliferação e apoptose.

Na primeira biópsia, houve maior número de células PCNA negativas na camada intermediária comparada aos seis meses, possivelmente porque os camundongos se encontravam em fase de crescimento, pois estavam com dois meses de idade, necessitando de ativa proliferação para acompanhar seu crescimento. Esses resultados estão de acordo com ROSS, (1998); que diz haver um balanço entre o número de mitoses e apoptoses conforme as necessidades do tecido epitelial. As células da camada basal estão ativamente proliferando. Células acima da camada basal estão quiescentes do ponto de vista de divisão celular, porém, ativas na sua função, estando em G0. As células escamosas maduras próximas da superfície do epitélio entram em apoptose quando sua função acaba.

Os resultados obtidos nessa etapa indicam que experimentos de curto prazo envolvendo o álcool poderão não mostrar seu real efeito.

Esses eventos não foram registrados na literatura porque não houve trabalhos com metodologia semelhante a este.

Na análise quantitativa feita aos 12 meses de experimento, o número total de células PCNA positivas (soma das células das camadas basal e intermediária) foi maior no grupo de animais que ingeriam álcool continuamente, conforme tabela 3.

Tabela 3. Comparação entre os grupos da contagem total de células PCNA positivas no momento 12 meses.

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Controle	49,75	17,02	42,48 ^A	0,02*
Álcool Tópico	48,14	12,90	39,09 ^A	
Álcool Contínuo	57,53	11,98	57,00 ^B	

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Observa-se que o grupo Álcool Contínuo possui valores superiores aos outros grupos estudados.

A tabela anterior mostra que o álcool ingerido continuamente produz efeito na proliferação celular, pois houve aumento na marcação de células PCNA positivas no epitélio lingual em animais que ingeriam álcool continuamente, em detrimento dos grupos Álcool Tópico e Controle.

As aplicações tópicas de álcool não alteraram a proliferação celular no respectivo grupo. Esse fato reforça o efeito da ingestão contínua de álcool na proliferação das células epiteliais estudadas. Com isso, se respondeu à dúvida inicial que sugeria um efeito local do álcool, o que não ocorreu. Conseqüentemente, o presente

trabalho contraria a interpretação de SIMANOWSKI et al. em 1986, SEITZ et. al em 1990 e HOMANN et al. em 1997 em relação ao mecanismo pelo qual o álcool induz maior proliferação celular, estes autores interpretaram o aumento da proliferação celular na mucosa do aparelho digestivo de ratos submetidos à ingestão de álcool, como sendo resultado do efeito local do álcool.

O grupo Controle além de ser a referência do que usualmente ocorre no tecido epitelial estudado, teve o objetivo de avaliar se o envelhecimento *per se*, poderia interferir na proliferação celular. Os resultados não mostraram alterações de proliferação com o avanço da idade nos camundongos desse grupo. Com isso, o aumento da proliferação celular no grupo Álcool Contínuo foi independente do envelhecimento, dependendo somente do efeito da ingestão contínua do álcool, conforme tabela 4.

Tabela 4. Comparação dos momentos da contagem de células Positivas no grupo Controle.

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Biópsia Inicial	52,85	16,75	58,13	0,770
Biópsia 6 meses	51,45	14,04	55,09	
Biópsia 12 meses	49,75	17,02	52,70	

Não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os momentos estudados.

O aumento na proliferação celular do grupo Álcool Contínuo se deu às expensas da camada intermediária, já que a quantificação na camada basal não apresentou alterações estatísticas significativas em nenhum momento do experimento, conforme tabela 5.

Tabela 5. Comparação entre os grupos da contagem de células PCNA positivas na camada intermediária no momento 12 meses.

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Controle	38,69	13,16	17,69 ^A	0,01*
Álcool Tópico	42,36	14,44	20,61 ^A	
Álcool Contínuo	54,81	13,55	31,84 ^B	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Foram verificadas diferenças estatísticas significativas no número de células PCNA positivas na camada intermediária para os grupos estudados. Observa-se que o grupo Álcool contínuo possui valores superiores em relação aos outros grupos. ($p=0,01$)

Não houve diferença estatística significativa na proliferação celular da camada basal entre os grupos, possivelmente porque ela está em constante proliferação fisiológica, conforme ROSS, (1998). Além disso, o PCNA usado como marcador de proliferação, está presente na maior parte do ciclo celular, podendo ser evidenciado nas fases G1,S e G2 sendo um método muito sensível, o que pode favorecer sua marcação.

Esses aspectos podem justificar a constante proliferação celular na camada basal dos três grupos pesquisados.

Na quantificação feita aos 12 meses de experimento, percebeu-se aumento da proliferação celular mostrando que o efeito do álcool se dá ao longo do tempo. Com isso, sugerimos que para avaliar de forma confiável o efeito do álcool no organismo, o experimento deverá ser a longo prazo, do contrário conclusões equivocadas poderão ser obtidas.

Esses achados não foram confirmados na literatura, pois não foram encontrados na literatura trabalhos com tamanho tempo de desenvolvimento.

O aumento da expressão do PCNA na camada intermediária do grupo Álcool Contínuo, foi interpretado como a persistência das células no ciclo celular, caracterizando maior índice proliferativo. Aquelas células que normalmente deixariam o ciclo na camada intermediária seguindo seu curso até a descamação, não o fizeram devido ao efeito do álcool.

O fato do álcool provocar aumento da proliferação celular ao longo do tempo nos reporta ao conceito de promoção tumoral descrito por BRASILEIRO FILHO, G. et al. (1994); promoção consiste na proliferação ou expansão de células já iniciadas, sendo um processo demorado, envolvendo reações teciduais causadas por

agentes promotores. Baseados nesse conceito e nos resultados de nosso trabalho, caracterizamos como sistêmico o efeito promotor de proliferação exercido pelo álcool.

Assim concordamos com as afirmações de PARISE Jr. (2000) que diz ser cada vez mais evidente que o álcool é um importante promotor de neoplasia.

É importante salientar que avaliou-se os efeitos proliferativos, não nos permitindo avaliar outros efeitos do álcool descritos por SQUIER et.al. 1986 e DU et.al em 2000, que o álcool localmente pode causar diminuição da espessura do epitélio, agir como solvente removendo conteúdo lipídico da membrana celular da mucosa e aumentar a permeabilidade do epitélio deixando-o mais vulnerável aos agentes carcinogênicos.

Vimos que o álcool produz seu efeito devido à ingestão contínua, no que diz respeito a proliferação celular e o seu papel promotor na carcinogênese é atribuído a essa ação sistêmica.

6-CONCLUSÕES

A partir da metodologia empregada e interpretação dos resultados é possível concluir que em epitélio lingual de camundongos:

- 1- O efeito do álcool na proliferação celular é devido a sua ingestão contínua.
- 2- A ação local do álcool não altera a proliferação celular.
- 3- Não há alteração da expressão do PCNA com o envelhecimento.

SUMMARY

This study aimed to evaluate the local and systemic effects of alcohol on cellular proliferation. Three groups of twenty mice were subject: Group I consumed 40° GL alcohol instead of wather during the experiment; group II was submitted to local applications of alcohol on the dorsum of the tongue, twice a week; and group III was the control group. The quantitative measurement of cellular proliferation was performed on the basal layer as well as the intermediate stratum of the epithelial tissue of the tongue by the evidenciation of PCNA, using the immunohistochemical technique. The quantification of cell proliferation was performed at three different moments: before alcohol consumption and six and twelve months after the beginning of the study. Results were compared among the mice of each group and also among the three groups. The results showed an increase in cellular proliferation on the intermediate layer of the epithelium of the group that consumed alcohol during the twelveth month ($p = 0,01$). The control group and the second one did not show significant differences in cellular proliferation at any moment during the study. Therefore, the conclusion in that alcohol effects on the cellular proliferation are due to the continuous ingestion and occurs throughout the life span.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. **Manual de imuno-histoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999.

BINNIE, W.; RONKIN, K.V. Etiology. In: WRIGHT, B.A.; WRIGHT, J.M.; BINNIE, W.H. **Oral cancer clinical and pathological considerations**. Florida: CRC Press, 1988. cap. 2, p. 13-32.

BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R.C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. et al. **Bogliolo patologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. cap. 8, p. 144-186.

BRUGERE, J. et al. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth. **Cancer**, New York, v. 57, n. 2, p. 391-395, Jan. 1986.

CHAVES DE OLIVEIRA, M.D.; NOVELLINO, A.T.N.; FREITAS, R.A. Expressão do PCNA em epitélio normal, hiperplásico e atípico de mucosa oral. **RPG Rev. Pós Grad.**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 149-154, abr./jun. 2000.

DU, X. et al. Penetration of N-nitrosornicotina (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, n. 2, p. 80-85, Feb. 2000.

FIORETTI, F. et al. Risk factors oral and pharyngeal cancer in never smokers. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 375-378, July 1999.

FREUND,G. Possible relationships of alcohol in membranes to cancer. **Cancer Res.**, Denville, v. 39, n. 7 pt. 2, p. 2899-2901, July 1979.

GOLDIM, J.R. **Pesquisa em saúde: leis, normas e diretrizes**. 3. ed. Porto Alegre: HCPA, 1997. 156 p.

GRAHAM, G.J.; RENNIE, J.S. Biochemical abnormalities of rat lingual epithelium following chronic alcohol intake. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 1-3, 1987.

HOMANN, N. et al. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 89, n. 22, p. 1692-1697, Nov. 1997.

JOHNSON, N.W. **Oral cancer**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 400 p.

JOVANOVIC, A. et al. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 22, n. 10, p. 459-462, Nov. 1993.

KATO, I.; NOMURA, A.M.Y. Alcohol in the aetiology of upper aerodigestive tract cancer. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, Headington Hill Hall, v. 30b, n. 2, p. 75-80, 1994.

MACLUSKEY, M. et al. The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, n. 4, p. 409-414, July 1999.

MASHBERG, A.; GARFINKEL, L.; HARRIS, S. Alcohol as a primary risk factor in oral squamous carcinoma. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v. 31, n. 3, p.146-155, May/June 1981.

McCOY, G.D.; WYNDER, E. L. Etiological and preventive implications in alcohol carcinogenesis. **Cancer Res.**, Denville, v. 39, n. 7 pt. 2, p. 2844-2850, July 1979.

MUTO, M. et al. Acetaldehyde production by non-pathogenic Neisseria in human oral microflora: implications for carcinogenesis in upper aerodigestive tract. **Int. J. Cancer**, New York, v. 88, n. 3, p. 342-350, Nov. 2000.

OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J. Aetiology of oral cancer: alcohol. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 36, n. 4, p. 247-251, Aug. 1998.

PARISE, J.R. **Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos**. São Paulo: Sarvier, 2000. 256 p.

RICH, A.M.; RADEN, B.G. Squamous cell carcinoma of the oral mucosa: a review of 244 cases in Australia. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 13, n. 5, p. 459-471, Oct. 1984.

ROSS, D.W. Cell growth and senescence. In: _____. **Introduction to oncogenes and molecular cancer medicine**. New York: Springer, 1998. cap. 2, p. 17-28

SEITZ, H.K. et al. Possible role of acetaldehyde in ethanol-related rectal cocarcinogenesis in rat. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 98, n. 2, p.406-413, Feb. 1990.

SIMANOWSKI, U.A. et al. Chronic alcohol consumption enhances rectal cell regeneration in man. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 106, n. 4, p. A442, Apr. 1994. Suppl.

SIMANOWSKI, U.A. et al. Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis. **Alcohol**, New York, v. 12, n. 2, p.111-115, Mar./Apr. 1995.

SQUIER, C.A.; COX, P.; HALL, B.K. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 15, n. 5, p. 276-279, May 1986.

SCHMIDT, W.; POPHAM, R.E. The role of drinking and smoking in mortality from cancer and other causes in male alcoholics. **Cancer**, New York, v. 47, n. 5, p. 1031-1041, Mar. 1981.

STEFANI, E. D. et al. Hard liquor drinking is associated with higher risk of cancer of the oral cavity and pharynx than wine drinking. A case-control study in Uruguay. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 99-104, Mar. 1998.

THERAPONDOS, G. et al. Health effects of alcohol and alcoholism. **Clin. Dermatol.**, New York, v. 17, n. 4, p. 381–389, July/Aug. 1999.

TUYNS, A.J. Epidemiology of alcohol and cancer. **Cancer Res.**, Denville, v. 39, n. 7 pt. 2, p. 2840-2843, July 1979.

WAHI, P.N. The epidemiological of oral and orofaryngeal cancer. A report of the study in Mainpuri District, Uttar Pradesh, India. **Bull. World Health Organ.**, Geneva, v. 38, n. 4, p.495-521, 1968.

WIGHT, A.J.; OGDEN, G.R. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer – a review. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 441-447, Nov. 1998.

ZHENG, T. et al. Risk of tongue cancer associated with tobacco smoking and alcohol consumption: a case-control study. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 82-85, Mar. 1997.

ANEXOS

ANEXO I - TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA DO PCNA:

Os cortes foram colocados em lâminas silanizadas (DAKO A/S, Denmark) e

a técnica seguiu os seguintes passos:

- Desparafinização em xilol;
- Desidratação em álcool etílico absoluto;
- Duas lavagens em água destilada;
- Recuperação antigênica onde os cortes foram colocados em um frasco de Coplin com tampão Citrato de pH 6.0 e levados ao forno de microondas em potência máxima (700 Watts) por 3 períodos de 5 minutos com intervalos de 2 minutos entre eles;
- Pausa de 20 minutos;
- Lavagem com água corrente;
- Lavagem com água destilada;
- Lavagem com PBS (phosphate-buffered saline) pH 7.2;
- Bloqueio da peroxidase endógena com dois banhos de 15 minutos em água oxigenada 10 volumes;
- Lavagem com água corrente;
- Lavagem com água destilada;
- Lavagem com PBS;

- Cada corte foi levemente seco e incubado com o anticorpo primário PCNA (clone PC10, DAKO A/S, Denmark) diluído na proporção 1:50 em DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components. (DAKO CORPORATION, CARPINTERIA, CA, USA), por uma hora em câmara úmida à 37°;
- Lavagem com PBS;
- Incubação com o anticorpo secundário (Biotinylated Goat Anti-mouse/Rabbit IG, DAKO A/S, Denmark) por 30 minutos a temperatura de 37°;
- Duas lavagens com tampão PBS;
- Revelação da reação com cromógeno DAB (3.3' – diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAKO Co, USA) por 5 minutos;
- Lavagem com água corrente;
- Lavagem com água destilada;
- Coloração com Hematoxilina de Harris por 30 segundos;
- Lavagem em água corrente;
- Desidratação em três banhos de álcool etílico absoluto;
- Clareamento em xilol;
- Montagem em Permount (Fisher ChemAlert®).

ANEXO II - ANÁLISE ESTATÍSTICA.

COMPARAÇÃO GERAL

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS

COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PARA O TEMPO: INICIAL

Tabela 1. Comparação dos grupos da contagem de células Positivas no momento inicial

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Controle	52,85	16,75	68,18	0,094
Álcool Tópico	49,38	14,22	61,88	
Álcool Contínuo	45,68	13,95	51,45	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os grupos estudados.

Tabela 2. Comparação dos grupos da contagem de células Negativas no momento inicial

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Controle	24,08	27,69	63,56	0,643
Álcool Tópico	17,15	18,98	56,50	
Álcool Contínuo	19,77	20,07	61,44	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os grupos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PARA O TEMPO: 6 MESES

Tabela 3. Comparação dos grupos da contagem de células Positivas no momento 6 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Controle	51,45	14,04	58,79	0,681
Álcool Tópico	50,00	17,28	55,39	
Álcool Contínuo	49,85	13,87	52,46	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os grupos estudados.

Tabela 4. Comparação dos grupos da contagem de células Negativas no momento 6 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Controle	11,76	12,07	52,78	0,675
Álcool Tópico	14,31	15,99	59,42	
Álcool Contínuo	12,73	14,34	54,95	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os grupos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PARA O TEMPO: 12 MESES

Tabela 5. Comparação dos grupos da contagem de células Positivas no momento 12 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Controle	49,75	17,02	42,48 ^A	0,02*
Álcool Tópico	48,14	12,90	39,09 ^A	
Álcool Contínuo	57,53	11,98	57,00 ^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 o número de células positivas para os grupos estudados. Observa-se que o grupo Álcool Contínuo possui valores superiores aos outros grupos estudados. (p=0,02)

Tabela 6. Comparação dos grupos da contagem de células Negativas no momento 12 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Controle	19,22	18,40	46,11	0,729
Álcool Tópico	21,18	21,03	49,61	
Álcool Contínuo	18,09	19,65	44,17	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os grupos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

COMPARAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS PARA O GRUPO: CONTROLE

Tabela 7. Comparação dos momentos da contagem de células Positivas no grupo controle

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>P</i>
Biópsia Inicial	52,85	16,75	58,13	0,770
Biópsia 6 meses	51,45	14,04	55,09	
Biópsia 12 meses	49,75	17,02	52,70	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os momentos estudados.

Tabela 8. Comparação dos momentos da contagem de células Negativas no grupo controle

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	24,08	27,69	60,08	0,115
Biópsia 6 meses	11,76	12,07	46,86	
Biópsia 12 meses	19,22	18,40	60,05	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os momentos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS PARA O GRUPO: ÁLCOOL TÓPICO

Tabela 9. Comparação dos momentos da contagem de células Positivas no grupo álcool tópico

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	49,38	14,22	51,00	0,944
Biópsia 6 meses	50,00	17,28	51,25	
Biópsia 12 meses	48,14	12,90	48,93	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os momentos estudados.

Tabela 10. Comparação dos momentos da contagem de células Negativas no grupo álcool tópico

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	17,15	18,98	48,58	0,386
Biópsia 6 meses	14,31	15,99	47,36	
Biópsia 12 meses	21,18	21,03	56,84	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os momentos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS PARA O GRUPO: ÁLCOOL CONTÍNUO

Tabela 11. Comparação dos momentos da contagem de células Positivas no grupo álcool contínuo

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	45,68	13,95	44,79 ^A	0,01*
Biópsia 6 meses	49,85	13,87	54,89 ^A	
Biópsia 12 meses	57,53	11,98	73,16 ^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 o número de células positivas para os momentos estudados. Observa-se que a Biópsia 12 meses apresentou valores superiores em relação aos outros momentos. ($p=0,01$)

Tabela 12. Comparação dos momentos da contagem de células Negativas no grupo álcool contínuo

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	19,77	20,07	60,26	0,331
Biópsia 6 meses	12,73	14,34	50,42	
Biópsia 12 meses	18,09	19,65	59,39	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os momentos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE AS CAMADAS

CAMADA BASAL

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS

COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PARA O TEMPO: INICIAL

Tabela 13. Comparação dos grupos da contagem de células Positivas no momento inicial

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	62,45	14,17	37,38	0,098
Álcool Tópico	53,90	12,00	27,15	
Álcool Contínuo	54,40	12,81	26,98	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os grupos estudados.

Tabela 14. Comparação dos grupos da contagem de células Negativas no momento inicial

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	2,85	4,25	31,55	0,841
Álcool Tópico	2,75	4,54	28,77	
Álcool Contínuo	2,90	4,17	31,17	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os grupos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PARA O TEMPO: 6 MESES

Tabela 15. Comparação dos grupos da contagem de células Positivas no momento 6 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	59,16	12,77	29,34	0,632
Álcool Tópico	60,19	14,31	29,81	
Álcool Contínuo	56,20	12,68	25,27	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os grupos estudados.

Tabela 16. Comparação dos grupos da contagem de células Negativas no momento 6 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	1,37	2,43	24,34	0,200
Álcool Tópico	2,38	2,83	33,34	
Álcool Contínuo	1,05	1,23	27,20	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os grupos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PARA O TEMPO: 12 MESES

Tabela 17. Comparação dos grupos da contagem de células Positivas no momento 12 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	60,81	12,82	25,25	0,165
Álcool Tópico	53,93	8,06	17,89	
Álcool Contínuo	60,25	9,86	26,66	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os grupos estudados.

Tabela 18. Comparação dos grupos da contagem de células Negativas no momento 12 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	3,38	4,95	22,16	0,493
Álcool Tópico	3,43	2,79	27,00	
Álcool Contínuo	2,50	3,06	21,78	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os grupos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPO

COMPARAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS PARA O GRUPO: CONTROLE

Tabela 19. Comparação dos momentos da contagem de células Positivas no grupo controle

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	62,45	14,17	29,60	0,784
Biópsia 6 meses	59,16	12,77	26,05	
Biópsia 12 meses	60,81	12,82	28,31	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os momentos estudados.

Tabela 20. Comparação dos momentos da contagem de células Negativas no grupo controle

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	2,85	4,25	29,30	0,174
Biópsia 6 meses	1,37	2,43	23,05	
Biópsia 12 meses	3,38	4,95	32,25	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os momentos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS PARA O GRUPO: ÁLCOOL TÓPICO

Tabela 21. Comparação dos momentos da contagem de células Positivas no grupo álcool tóxico

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	53,90	12,00	23,45	0,481
Biópsia 6 meses	60,19	14,31	29,09	
Biópsia 12 meses	53,93	8,06	24,32	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os momentos estudados.

Tabela 22. Comparação dos momentos da contagem de células Negativas no grupo álcool tóxico

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	2,75	4,54	21,92	0,182
Biópsia 6 meses	2,38	2,83	25,16	
Biópsia 12 meses	3,43	2,79	31,00	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os momentos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS PARA O GRUPO: ÁLCOOL CONTÍNUO

Tabela 23. Comparação dos momentos da contagem de células Positivas no grupo álcool contínuo

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	54,40	12,81	24,85	0,252
Biópsia 6 meses	56,20	12,68	27,88	
Biópsia 12 meses	60,25	9,86	33,84	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os momentos estudados.

Tabela 24. Comparação dos momentos da contagem de células Negativas no grupo álcool contínuo

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	2,90	4,17	28,92	0,350
Biópsia 6 meses	1,05	1,23	24,90	
Biópsia 12 meses	2,50	3,06	32,47	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os momentos estudados.

CAMADA INTERMEDIÁRIA

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS

COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PARA O TEMPO: INICIAL

Tabela 25. Comparação dos grupos da contagem de células Positivas no momento inicial

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	43,25	13,46	32,47	0,217
Álcool Tópico	44,85	15,11	34,03	
Álcool Contínuo	36,95	8,66	25,00	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os grupos estudados.

Tabela 26. Comparação dos grupos da contagem de células Negativas no momento inicial

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	45,30	24,63	35,35	0,149
Álcool Tópico	31,55	16,80	24,70	
Álcool Contínuo	36,65	14,49	31,45	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os grupos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PARA O TEMPO: 6 MESES

Tabela 27. Comparação dos grupos da contagem de células Positivas no momento 6 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	43,74	10,80	30,55	0,616
Álcool Tópico	39,81	13,81	25,22	
Álcool Contínuo	43,50	12,21	27,80	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os grupos estudados.

Tabela 28. Comparação dos grupos da contagem de células Negativas no momento 6 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	22,16	8,08	26,00	0,736
Álcool Tópico	26,25	14,72	30,25	
Álcool Contínuo	24,40	11,55	28,10	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os grupos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PARA O TEMPO: 12 MESES

Tabela 29. Comparação dos grupos da contagem de células Positivas no momento 12 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	38,69	13,16	17,69 ^A	0,01*
Álcool Tópico	42,36	14,44	20,61 ^A	
Álcool Contínuo	54,81	13,55	31,84 ^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 o número de células positivas para os grupos estudados. Observa-se que o grupo Álcool contínuo possui valores superiores em relação aos outros grupos. (p=0,01)

Tabela 30. Comparação dos grupos da contagem de células Negativas no momento 12 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	35,06	11,83	23,81	0,510
Álcool Tópico	38,93	15,23	26,36	
Álcool Contínuo	33,69	16,42	20,69	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os grupos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

COMPARAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS PARA O GRUPO: CONTROLE

Tabela 31. Comparação dos momentos da contagem de células Positivas no grupo controle

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	43,25	12,46	29,23	0,436
Biópsia 6 meses	43,74	10,80	30,32	
Biópsia 12 meses	38,69	13,16	23,72	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os momentos estudados.

Tabela 32. Comparação dos momentos da contagem de células Negativas no grupo controle

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	45,30	24,63	35,53 ^A	0,01*
Biópsia 6 meses	22,16	8,08	16,58 ^B	
Biópsia 12 meses	35,06	11,83	32,16 ^A	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os momentos estudados. Observa-se que na Biópsia realizada em 6 meses o número de células negativas diminuiu. (p=0,01)

COMPARAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS PARA O GRUPO: ÁLCOOL TÓPICO

Tabela 33. Comparação dos momentos da contagem de células Positivas no grupo álcool tópico

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	44,85	15,11	27,67	0,671
Biópsia 6 meses	39,81	13,81	23,47	
Biópsia 12 meses	42,36	14,44	24,71	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células positivas para os momentos estudados.

Tabela 34. Comparação dos momentos da contagem de células Negativas no grupo álcool tópico

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	31,55	16,80	24,60	0,098
Biópsia 6 meses	26,25	14,72	20,81	
Biópsia 12 meses	38,93	15,23	32,14	

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre o número de células negativas para os momentos estudados.

COMPARAÇÃO ENTRE OS MOMENTOS PARA O GRUPO: ÁLCOOL CONTÍNUO

Tabela 35. Comparação dos momentos da contagem de células Positivas no grupo álcool contínuo

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	36,95	8,66	19,60 ^A	0,01*
Biópsia 6 meses	43,50	12,21	28,00 ^A	
Biópsia 12 meses	54,81	13,55	40,25 ^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 o número de células positivas para os momentos estudados. Observa-se que o momento 12 meses apresenta valores superiores. (p=0,01)

Tabela 36. Comparação dos momentos da contagem de células Negativas no grupo álcool contínuo

<i>Biópsia</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Biópsia Inicial	36,65	14,49	34,97 ^A	0,02*
Biópsia 6 meses	24,40	11,55	20,75 ^B	
Biópsia 12 meses	33,69	16,42	30,09 ^A	

* 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 o número de células negativas para os momentos estudados. Observa-se que na Biópsia realizada no período de 6 meses possui uma contagem de células negativas inferior. (p=0,02)

ANÁLISE DOS PESOS PARA OS GRUPOS ESTUDADOS

COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS

Tabela 37. Comparação dos pesos no grupo Controle

<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 de pesos obtidos nos três momentos diferem entre si. ($p=0,01$)

Tabela 38. Comparação dos pesos no grupo Álcool Contínuo

<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 o peso para os momentos estudados.

Tabela 39. Comparação dos pesos no grupo Álcool Tópico

<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 o peso para os momentos estudados. Observa-se que os valores de pesos obtidos nos três momentos diferem entre si. (p=0,01)

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

Tabela 40. Comparação dos pesos 6 meses

<i>Grupo</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>Rank Médio</i>	<i>p</i>
Controle	37,99	3,27	28,82 ^A	0,01*
Álcool Contínuo	34,25	2,85	8,55 ^B	
Álcool Tópico	36,44	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 o peso 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. (p=0,01)

Tabela 41. Comparação dos pesos 12 meses

<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 o peso 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. (p=0,01)

ANÁLISE DOS PESOS DE RAÇÃO CONSUMIDA ENTRE OS GRUPOS

Tabela 42. Comparação dos pesos de ração consumida

<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)

COMPARAÇÃO ENTRE PERÍODOS

Tabela 43. Comparação dos pesos de ração consumida por períodos

<i>Período</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>p</i>
Verão	475,70 ^A	86,94	0,01*
Outono	475,86 ^A	84,49	
Inverno	578,20 ^B	108,54	
Primavera	378,78 ^C	116,94	

* 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 períodos estudados. Observa-se que o peso médio de ração consumida no Inverno apresenta a maior média, seguida pelos períodos Verão e Outono, que por fim, diferem do período primavera. (p=0,01)

ANÁLISE DA QUANTIDADE DE BEBIDA CONSUMIDA ENTRE OS GRUPOS

Tabela 44. Comparação entre as quantidades de bebidas consumidas 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 água consumida para os grupos estudados. Observa-se que a quantidade de álcool consumida pelo grupo Álcool Contínuo foi inferior ao restante dos outros grupos. ($p=0,01$)

COMPARAÇÃO ENTRE PERÍODOS

Tabela 45. Comparação entre as quantidades de bebidas consumidas

<i>Período</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio-Padrão</i>	<i>p</i>
Verão	248,21	81,66	0,814
Outono	256,70	81,07	
Inverno	250,71	85,50	
Primavera	262,24	77,85	

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste Kruskal-Wallis, não foram verificadas diferenças estatísticas significativas entre a quantidade de água consumida para os períodos estudados.