

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

**ÁLCOOL E PROLIFERAÇÃO CELULAR: AVALIAÇÃO
EM LÍNGUA DE RATOS EXPOSTOS AO
CONSUMO DE ETANOL A 5%**

MILLANE FABÍOLA COUTINHO DE LIRA GODOI

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

*Dissertação
apresentada como
parte dos requisitos
obrigatórios para
obtenção do título de
Mestre em
Odontologia, área de
Concentração em
Clínica Odontológica-
Cirurgia e
Traumatologia Buco
Maxilo Facial.*

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

PORTO ALEGRE

2010

*“ A Ti, Senhor nosso Deus, porque todas as coisas
Tu criaste, sim, por causa da Tua vontade vieram
a existir e foram criadas.”
Apoc 4,11b.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, Jesus Cristo, amado da minha alma, não só dedico este trabalho como agradeço por viabilizar todas as coisas em minha vida. Tu és minha porção, Tu és o meu refúgio, em Teus braços sempre encontro salvação.

Aos meus pais, Milson e Ladjane, por serem exemplos em tudo na minha vida, por serem OS MELHORES pais do mundo, por deixarem claro nas filhas que as maiores riquezas são aquelas que ninguém pode roubar, a fé em Deus e os estudos. Sou muito grata a Deus por ser filha de vocês, amo muito vocês.

Ao meu marido Romulo, amigo, companheiro, pastor, cuidador que em todos os momentos acredita em mim, me compreende, me protege, me ajuda e me ama. Obrigada por toda paciência e dedicação. Amo você.

AMOR DA MINHA VIDA!!! Quem será que a mamãe está falando? A princesa mais linda do mundo, Camillinha, a filha que sempre pedi a Deus, maravilhosa e doce. Você é o melhor presente de Deus, sou a mãe mais abençoada do mundo, pois tenho você. AMO MUITO SUA VIDA!

A minha sogra, Valdereis, amiga, querida, incentivadora, dentista, que é como uma mãe para mim. Tenho muita alegria em ter a senhora como sogra, obrigada por me ajudar sempre, acreditar em mim e me amar como filha, também amo você.

A minha vó Severina, minha mãe que, como ela diz, só não nasci dela, mas sou sua filha, obrigada pelo incentivo, amor e investimento que já fizesse em minha vida. Preciosa, amo você.

As minhas irmãs Manuelle e Mariane, minhas amigas que me respeitam até quando vacilo, são sempre prestativas, assumem o meu papel na vida de Camilla todas às vezes que preciso viajar para estudar e servir a Pátria. Fazem tudo para mim. Vocês são muito importantes em minha vida, as melhores irmãs do mundo, companheiras, minhas amigas nas quais eu mais confio.

Aos meus cunhados, Fernando e Júlio, irmãos que Deus me deu, maridos abençoados das minhas irmãs, que se fosse para eu escolher, não saberia fazer tão bem como Deus fez, colocando vocês na vida das minhas “filhas”, digo, irmãs.

As minhas tias Qêu e Eliane, que sempre acham que somos, os seus filhos e sobrinhos, os melhores do mundo. Obrigada, pois esse amor de vocês nos incentivam a ir mais longe. Vocês são muito importantes em minha vida, amo vocês!

Aos meus tios Írio e Sérgio (*in memorian*) vocês são muito importantes para mim, sempre foram exemplo de homens bons e cuidadosos com a família, obrigada pela admiração que sempre depositaram e mim, também admiro vocês!

Aos meus primos Serginho, Iriozinho, Max, Léo, Nano, Lili, Angélica, Déa e Andresa, que sempre me apoiaram. Vocês são muito especiais em minha vida, foi muito bom crescer ao lado de vocês, são para mim como irmãos.

Aos meus avós, Camilo (*in memorian*) e Maria do Carmo, obrigada pelo amor e dedicação. Que sempre acreditaram em mim.

As minhas tias Mercês, Lourdes, Telinha, Cristina, Gorete e Salete, pela participação em minha vida!

Ao meu orientador Prof. Dr. Manoel Santa`Ana Filho. A sua maneira intensa e dedicada ao magistério nos estimula a persistir, pois professores como o senhor, onde a sabedoria é tão grande quanto à humanidade, nos dá segurança e nos mantém focados nos nossos objetivos. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados por ser um exemplo de professor.

Ao Prof. Dr. Vinícius Carrard pelo seu exemplo de amor pelo que faz, pelas suas importantes contribuições neste trabalho. Obrigada pelas orientações, correções, ensinamentos, discussões e pela ajuda, muito grande, na estatística deste.

À “minha professora” Isabel Lauxen pelo exemplo e dedicação em tudo que faz, pela participação fundamental nesta dissertação, pela paciência nas minhas dificuldades. Obrigada.

Às Profa. Dra. Márcia Gaiger de Oliveira pela sua tranqüilidade em transmitir conhecimentos.

Às professoras Dra. Manoela Martins e Etiene, pelas suas importantes contribuições.

Ao Professor Dr. Marcelo Lazzaron Lamers, pelo exemplo de dedicação e pelos ensinamentos fundamentais e valiosos.

À Adriana Aguiar por todo auxílio.

Às queridas Chris e Alessandra, pela dedicação ao laboratório de patologia, pelo profissionalismo e, principalmente, pela dedicação a esta pesquisa.

À Claudinha Freire pela amizade, pelo cuidado comigo e com as minhas coisas na pós-graduação. Você foi um anjo de Deus nesse lugar, desejo todas às bênçãos para sua vida, onde Deus lhe colocar!

À Paulinha, amiga e companheira, você torna os dias de estudo alegres. Ter uma amiga e colega como você é um privilégio.

À aluna de graduação e bolsista de iniciação científica Nicole Marchioro dos Santos pela dedicação a este trabalho, contagem de células comigo, interesse em me ajudar e aprender, sua dedicação foi fundamental para o sucesso deste.

À Adriana Inchausti Jou pela amizade e companhia.

Às colegas Laura Hildebrand, Ana Luisa Homem de Carvalho e Francinne Miranda pelos ensinamentos e, como “antiguidade é posto”, pelas orientações e direções.

À Fernanda Visioli pelo exemplo de dedicação e pela tranquilidade que transmite.

À Ana Carolina, recém chegada, pelo empenho.

À Lisiane Bernardi pela alegria em fazer seus trabalhos e empenho. Obrigada pela sua amizade.

Às bibliotecárias da FO – UFRGS por estarem sempre dispostas a ajudar.

Ao meu comandante Cel Azeredo pelo incentivo à vida acadêmica.

Aos meus chefes da Força Aérea Brasileira, Ten Cel Martini e Major Cláudia, pelo apoio e compreensão. Ao Ten Cel Fernandes pela motivação nos estudos.

Aos colegas do Hospital de Aeronáutica de Canoas pela parceria, principalmente, às tenentes: Mariana Bachur, Helga Betany, Juliana Marques, Luana, Évelin, Mariana (colega de pós-graduação), Diana, Karina Becker, Joseane e Emanuele.

Ao Ten Cel Gilson, Odontoclínica de Aeronáutica de Recife, pelo incentivo, amizade, confiança em mim e exemplo de caráter e dignidade.

À minha amiga, irmã, mãe na fé, Lígia Maria, militar exemplar, dentista que, nas horas mais angustiantes da minha vida, esteve ao meu lado e me mostrou que a confiança em Deus é o segredo da vitória. Você é muito importante em minha vida!

Ao apóstolo Doriel e à pastora Liane pelas constantes orações e cuidados com minha vida. À minha pastora Fátima Regina pela dedicação e amor as coisas de Deus que são exemplos para todos nós. Obrigada por cuidar sempre da minha família.

Aos profetas (Nicanor e Lourdes) *in memoriam*, Neroaldo e Maria por serem participantes intensos deste momento.

Aos queridos da Igreja Obreiros de Cristo de Canoas pelas orações e compreensão pelas minhas ausências.

SUMÁRIO

RESUMO	<u>7</u>
ABSTRACT	<u>8</u>
ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	<u>9</u>
OBJETIVO	<u>16</u>
REFERÊNCIAS	<u>17</u>
ARTIGO	<u>20</u>
<i>Introdução.....</i>	<i><u>21</u></i>
<i>Materiais e Métodos.....</i>	<i><u>22</u></i>
<i>Resultados.....</i>	<i><u>27</u></i>
<i>Discussão.....</i>	<i><u>35</u></i>
<i>Conclusão.....</i>	<i><u>37</u></i>
<i>Referências</i>	<i><u>39</u></i>
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	<u>41</u>

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a proliferação celular de ceratinócitos no dorso e ventre de língua de ratos submetidos à ingestão de etanol a 5%, por meio da técnica de AgNOR, sendo um estudo experimental randomizado, em paralelo, cego, controlado. Foi analisado o epitélio lingual (Dorso e Ventre) de 30 ratos, divididos em 2 grupos (Teste e Controle). Foram quantificadas a média e a percentagem de AgNOR das células das camadas basal e suprabasal, comparando os grupos, pelo período de 9 semanas. Os resultados mostram que houve diferença estatisticamente significativa no grupo teste (etanol), com uma maior atividade proliferativa para o ventre, quando $p \text{ AgNOR} > 3$ e $p \text{ AgNOR} > 4$. Conclui-se que a exposição ao etanol a 5% provoca alterações de proliferação no modelo estudado.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the cellular proliferation of keratinocytes in the dorsal and ventral surface of tongue of rats after ingestion of ethanol to 5% by AgNOR technique, being an experimental randomized, parallel, blinded, controlled. Lingual epithelium was examined (dorsal and ventral) of 30 rats were divided into two groups (Test and Control). Were quantified and the average percentage of AgNOR cell basal and suprabasal layers, comparing the groups for a period of nine weeks. The results show a statistically significant difference in the test group (ethanol) with a higher proliferative activity to the control group, when AgNOR p > 3 AgNOR p > 4. It is concluded that exposure to 5% ethanol causes changes in proliferation in this model.

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O câncer de boca é o sétimo tipo de câncer mais incidente na população brasileira. Foram estimados para o ano de 2008 mais de 14.000 novos casos no Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2010), e para o ano de 2010 cerca de 14.120 novos casos, sendo 10.330 do sexo masculino e 3.790 no sexo feminino. Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal estão o uso do tabaco e a ingestão de álcool. O álcool está presente em uma série de soluções, como xaropes, colutórios e bebidas estando a população exposta aos seus efeitos (SAALFELD, SILVA, 1993). A cerveja, bebida alcoólica popular e consumida no Brasil, possui concentração média de 6% de etanol, o que leva ao interesse pela pesquisa.

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 (nitrosornicotina – 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 na concentração de 5%, após várias 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 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 enxaguetórios bucais e também em alguns medicamentos infantis, como os xaropes.

O mesmo grupo do estudo anterior (DU *et al.*, 2000) estudou 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. Estes autores levantam a possibilidade que em uma concentração mais elevada – por exemplo, 50% de

etanol – haver uma fixação do epitélio, fato que dificultaria a penetração do etanol promovendo uma diminuição na permeabilidade.

As regiões anatômicas mais acometidas por essa patologia são o vermelhão do lábio inferior, borda de língua e o assoalho de boca (INCA, 2010).

Cançado et al. (2001) estudaram a influência do consumo de fumo e de álcool na proliferação epitelial da mucosa bucal, do assoalho de boca e borda de língua. A partir da utilização da técnica de AgNOR, encontraram uma maior proliferação celular na mucosa do assoalho quando comparada à mucosa da borda de língua.

Por outro lado, Paiva et al. (2004) observaram taxa proliferativa similar em diferentes sítios anatômicos independente do padrão de ceratinização e da exposição aos fatores de risco, que havia atividade de proliferação celular similares entre a mucosa ceratinizada e não ceratinizada nos pacientes expostos, bem como nos não expostos, aos carcinógenos do tabaco. Achados nesse estudo sugerem que a borda de língua pode ser mais susceptível no aumento da proliferação celular quando os efeitos do tabaco são avaliados.

Gedoz et al. (2007) observaram um aumento da proliferação celular por meio da quantificação das AgNORs no lábio inferior, na borda de língua, no assoalho bucal em indivíduos fumantes ou consumidores habituais de álcool.

Estudos demonstraram que a ingestão crônica de etanol altera o processo de renovação celular, havendo um aumento da proliferação da célula (SIMANOWSKI *et al.*, 1994; SIMANOWSKI *et al.*, 1995; HOMANN *et al.*, 1997; MAITO *et al.*, 2003; CARRARD *et al.*, 2004). Na mucosa bucal esta proliferação foi analisada com diferentes marcadores, como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e a técnica de AgNOR (MAITO *et al.*, 2003; CARRARD *et al.*, 2004).

O Carrard et al. (2004) na mesma amostra de Maito et al. (2003) quantificou o AgNOR e observou os núcleos das células da camada basal e células da camada intermediária. Os resultados desses estudos mostraram que entre 6 e 12 meses houve aumento da proliferação na camada suprabasal da mucosa dos camundongos que ingeriram etanol a 40%. Os autores observaram que não houve modificação na atividade proliferativa com o envelhecimento (CARRARD *et al.*, 2008), já que no grupo controle não ocorreu variação na quantificação de AgNORs, concordando com Maito et al. (2003) que também verificaram não haver

alteração na expressão de PCNA com o envelhecimento. Ambos os estudos sugerem que as células da camada suprabasal são as responsáveis pelo aumento da proliferação celular, concordando com estudos realizados previamente (HOMANN *et al.*, 1997; HOMANN *et al.*, 2001). A partir dessa observação sugeriu-se que células continuam proliferando na camada suprabasal devido às injúrias provocadas pelo etanol (MAITO *et al.*, 2003).

Por outro lado, na mesma amostra de Maito *et al.* (2003), Sanfelice *et al.* (2003) e Carrard *et al.* (2004) observaram a diminuição na espessura do epitélio bucal exposto ao etanol, concordando com outros estudos morfológicos da mucosa bucal (VALENTINE *et al.*, 1985; MAIER *et al.*, 1994). Esse fato pode ser atribuído à diminuição na ceratinização ou ao aumento da descamação do epitélio bucal. Pode-se pensar também que exista uma relação de causalidade entre essas alterações, uma vez que o aumento da proliferação celular pode ser uma resposta ao aumento da apoptose e/ou da descamação na função de manter a homeostasia do tecido (MAITO *et al.*, 2003; CARRARD *et al.*, 2004). Contudo, foi observado que tanto a exposição tópica ao etanol como a ingestão causam diminuição na espessura, mas somente a ingestão de etanol provoca aumento de proliferação, concluindo-se que o aumento da descamação não provoca uma maior atividade proliferativa celular (MAIER *et al.*, 1994; MAITO *et al.*, 2003; CARRARD *et al.*, 2004).

Alguns estudos experimentais enfocaram na influência do consumo de álcool sobre a morfologia e o processo de renovação celular do epitélio bucal. A maioria deles concordou que o seu consumo crônico provoca uma diminuição da sua espessura (MASCRES, JOLY, 1981; VALENTINE *et al.*, 1985; MAIER *et al.*, 1994; SANFELICE *et al.*, 2003), o que poderia ser causado pelo aumento da descamação (OGDEN, WIGHT, RICE, 1999) ou pela redução do volume celular (VALENTINE *et al.*, 1985; MARTINEZ *et al.*, 1998; MARTINEZ *et al.*, 2000). Alguns autores mostraram aumento da proliferação celular decorrente do consumo crônico de álcool (MAIER *et al.*, 1994; HOMANN *et al.*, 1997; MAITO *et al.*, 2003; e CARRARD *et al.*, 2004), enquanto Mascres, Joly (1981), Martinez *et al.* (1998), Slomiany *et al.* (1998) e Martinez *et al.* (2000) constataram aumento da autólise ou morte celular. Apesar da aparente contradição entre estes resultados, a compreensão da complexidade do processo de renovação celular do epitélio permite sugerir que o aumento da proliferação celular nas camadas mais

profundas deste tecido ocorra como uma resposta adaptativa ao aumento da morte celular nas camadas mais superficiais, a fim de manter homeostase (CARRARD *et al.*, 2004). Dessa forma, o aumento da proliferação celular estaria atuando de maneira compensatória para manter a integridade do tecido epitelial. Por outro lado, esse aumento da proliferação poderia favorecer uma maior ocorrência de mutações e danos cumulativos, aumentando o risco de desenvolvimento do câncer. Contudo, não se sabe, até o presente momento, se esse aumento da proliferação é apenas resultado desse fenômeno adaptativo ou se é provocado por alterações nos genes que regulam a proliferação celular.

A técnica da impregnação pela prata das regiões organizadoras nucleolares (AgNORs) é um dos métodos de análise da proliferação celular. As regiões organizadoras nucleolares (NORs) são segmentos de DNA que em humanos localizam-se no braço curto dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 e servem de molde para a codificação do RNA ribossômico (GIRI *et al.*, 1989). Com a técnica de AgNOR, observam-se as NORs que estão sendo ativamente transcritas (HERNADEZ-VERDUN, 1983) visualizadas como pequenos pontos pretos no interior do núcleo amarronzado. Muitos estudos mostraram que a quantidade de AgNORs por núcleo está relacionada com a velocidade de progressão do ciclo celular indicando que há relação entre o número de AgNORs por núcleo e prognóstico (TRERÉ, 2000; DERENZINI *et al.*, 2000).

A relação positiva entre média do número de AgNORs/núcleo (mAgNOR) e prognóstico foi demonstrada por alguns autores (SANO *et al.*, 1991; PICH;CHIUSA; MARGARIA, 2000; DERENZINI *et al.*, 2004).

A quantidade de AgNORs foi estudada em 39 casos de carcinomas espinocelulares de boca e relacionaram este dado com a graduação histológica e prognóstico dos referidos casos. A quantidade das AgNORs foi dada através da média da quantidade de AgNORs por núcleo (mAgNOR), por tratar-se de um método simples e de boa reprodutibilidade. Os casos foram divididos em bom prognóstico (sem recidiva e ausência de metástases em cinco anos) e mau prognóstico (óbito em dois anos após o diagnóstico). Os casos foram classificados de acordo com o sistema TNM e todos se apresentavam sem metástase. Os autores concluíram que altas quantidades de AgNORs poderiam ser consideradas um marcador de prognóstico desfavorável, uma vez que o grupo classificado como mau prognóstico apresentou as maiores quantidades de

AgNORs. Carcinomas graduados como grau II tiveram altas médias de AgNORs assim como prognóstico desfavorável. (SANO *et al.*, 1991).

Pich, Chiusa e Margaria (2000) avaliaram se, em algumas neoplasias humanas, a quantidade de AgNORs era realmente um fator prognóstico importante. Mostraram que além de um fator independente de prognóstico em alguns tumores humanos também contribui na estratificação de pacientes nos diferentes grupos de risco (presença ou não de metástase) a fim de oferecer-lhe as diferentes terapias. Concluíram que grandes quantidades de AgNORs por núcleo caracterizam um aumento da atividade metabólica e de conteúdo de DNA de uma célula pouco diferenciada.

Outro método para avaliação das AgNORS é a percentagem de células com 1, 2, 3, 4 ou mais AgNORs por núcleo (pAgNOR), introduzido por Xie *et al.* (1997). Mostraram que tanto pAgNORs quanto mAgNOR permitem a distinção entre o epitélio normal, displasia e carcinomas espinocelulares de boca e que pAgNOR maior que 1 é um indicador de recidiva e sobrevida curta em casos classificados como T1 e T2, sugerindo que a contagem das AgNORs deveria fazer parte da rotina histopatológica nos casos de carcinoma espinocelular de boca.

Ray, Chattopadhyay e Kaplan (2003) selecionaram 52 casos de leucoplasias localizadas na cavidade bucal e por meio de lâminas coradas por hematoxilina-eosina (H/E) os classificaram em displásicos e não displásicos. Estes mesmos casos foram submetidos à técnica de AgNOR e as NORs ativas quantificadas utilizando-se os parâmetros de média (mAgNOR) e percentual (pAgNOR). Os dois métodos, contagem de AgNORs por núcleo e diagnóstico histopatológico, discordaram em 37% dos diagnósticos. Tanto as leucoplasias displásicas quanto as não displásicas mostraram grandes médias de AgNORs, sendo que pAgNOR foi suficiente para o diagnóstico de displasia, diferente de mAgNOR. A média de AgNORs constitui-se um critério para definir o diagnóstico de displasias epiteliais.

Oliveira *et al.* (2005) também avaliaram a contagem das AgNORs através de mAgNOR e pAgNOR em 18 casos de carcinoma espinocelular de língua e relacionaram tais parâmetros com a graduação histopatológica (WAHI, 1971) destes tumores. Concluíram que as AgNORS têm relação direta com a classificação histopatológica de Wahi (1971), sugerindo que a técnica de AgNORs

por núcleo (mAgNOR) e principalmente pAgNOR podem ser usados para avaliar o comportamento proliferativo dos carcinomas espinocelulares de língua, principalmente naqueles classificados como grau II.

Xie et al. (1999) investigaram os marcadores de apoptose (proteína Bax) em 220 pacientes com carcinoma espinocelular de língua. Tais achados foram relacionados com parâmetros clínicos e resposta ao tratamento. Falhas no tratamento, ou seja, tumores que não responderam à terapia tiveram maiores porcentagens de células positivas para Ki-67, assim como a média da contagem das AgNORs (mAgNOR) e o percentual de AgNORS por núcleo (pAgNOR).

As AgNORs podem ser quantificadas a partir da média dos pontos de AgNOR por núcleo (mAgNOR), da área média dos pontos de AgNOR por núcleo e do percentual médio de pontos de AgNOR por núcleo (pAgNOR). A contagem da média dos pontos de AgNOR por núcleo diretamente no microscópio óptico foi o primeiro método de avaliação proposto por Crocker et al. (1989), entretanto foi considerado subjetivo e pouco reprodutível quando os pontos aparecem sobrepostos e são contados como um AgNOR (TRERÈ, 2000). Além disso, este método não leva em consideração a dimensão de cada ponto, que pode ser muito variável em células com alta velocidade de duplicidade.

O pAgNOR avalia a porcentagem de células com 1, 2, 3, 4 ou mais pontos de AgNOR por núcleo (MOURAD *et al.*, 1992). Xie et al. (1997) observaram que o pAgNOR se mostrou mais eficaz para determinar o prognóstico do carcinoma espinocelular do que o mAgNOR, sendo que o pAgNOR>1 evidenciaria melhor esta relação. Segundo os autores, este método de contagem é mais fácil e não necessita equipamentos sofisticados para sua realização.

Origem da Amostra

Trata-se de um estudo realizado em modelo animal, sendo prospectivo, randomizado, controlado e cego.

Foi utilizado um total de 30 ratos Wistar, com idades entre 45-60 dias, que foram divididos em 2 grupos (teste e controle) por meio de randomização estratificada. Os animais foram alocados em seis caixas-moradias de plástico dentro do biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e permaneceram em um ambiente climatizado a uma temperatura que variou de 18

a 22°C. Foi respeitado um ciclo alternativo claro/escuro de 12 horas e foi oferecido a ambos os grupos uma dieta *ad libitum* contendo ração e líquido com ou sem a presença de etanol. Após divididos em número de cinco animais por caixa, os mesmos receberam numeração de 1 a 5 realizadas através de riscos com caneta marcadora permanente no rabo e as caixas receberam identificação dentro dos grupos controle (C1, C2 e C3) e teste (T1, T2 e T3).

Para os ratos do grupo teste (Etanol) foi administrada uma solução diariamente contendo etanol numa concentração de 5% ao longo de 9 semanas. Para o segundo grupo (Controle) foi administrada apenas a água destilada. O tratamento em ambos os grupos ocorreu igualmente sendo que os dois grupos receberam, juntamente com o líquido do respectivo grupo, a mesma ração como complemento da dieta. Para a obtenção de líquido contendo etanol numa concentração de 5%, foi utilizada uma proveta de 500ml onde foi misturado 25ml de álcool etílico 100% PA (Vetec Química Fina Ltda.) a 475ml de água destilada.

Com o período experimental encerrado, os animais foram sacrificados por meio de câmara de Dióxido de Carbono. Foi coletada língua e a peça foi cortada no sentido longitudinal, os fragmentos foram fixados em formalina tamponada a 10% por um período de 24h. Após esse período os fragmentos seguiram o processamento histotécnico e incluídos em parafina histológica. A inclusão das peças respeitou a orientação transversal, para que se pudesse ver toda a estratificação epitelial e a relação entre tecido epitelial e conjuntivo (MAITO *et al.*, 2003; SANFELICE *et al.*, 2003).

Os ratos, após sacrifício e obtenção das peças para análise, foram colocados em sacos plásticos e encaminhados para descarte seguindo o protocolo do biotério da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

OBJETIVO

Avaliar a proliferação celular de ceratinócitos do ventre e do dorso de língua de ratos submetidos à ingestão de etanol a 5%, por meio da técnica de AgNOR, no período de 9 semanas.

REFERÊNCIAS

BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

Cançado R. P., Sant'Ana Filho M., Yurguel L. S. Evaluation of nucleolar organizer region associated proteins in exfoliative cytology of normal buccal mucosa: Effect of smoking. Oral Oncol 2001; 37 ;446-54.

Carrard V. C., Filho M.S., Rados P. V., Chaves A. C., Lauxen I. da S. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of alcohol. Alcohol, 2004, 34, 2-3, 233-8.

Carrard V. C., Pires Aline Segatto, Badauy, C. M., Rados P. V., Lauxen I. da S., Sant'ana Filho, M. Effects of Aging on Mice Tongue Epithelium- Focusing on Cell Proliferation Rate and Morphology Aspects. Bulletin of Tokyo Dental College, 2008, 49, 199-205.

Crocker J., Boldy D. A. R., Egan M. J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. Journal of Pathology, 1989, 158, 185-8.

Derenzini M., Treré D., Pession A., Govoni M., Sirri V., Chieco P. Nucleolar Size Indicates the Rapidity of Cell Proliferation in Cancer Tissues. J Pathol, 2000, London, 191, 2, 181-6.

Derenzini M., Ceccarelli C., Santini D., Taffurelli M., Treré D. The Prognastic Value of the AgNOR Parameter in Human Breast Cancer Depends on the pRB and p53 Status. J Clin Pathol, 2004, London, 57, 755-61.

Du X., Squier C. A., Kremer M. J., Wertz P. W. Penetration of N-Nitrosornicotine (NNN) Across Oral Mucosa in the Presence of Ethanol and Nicotine. J. Oral Pathol. 2000, Med. Copenhagen, 29, 2, 80-5.

Gedoz L., Lauxen I. S., Sant'ana Filho M., Rados P. V. Proliferation Activity in Clinically Healthy Oral Mucosa Exposed to Tobacco Smoking and Alcohol. Analytical and Quantitative Cytology and Histology. 2007, 29, 0.

Giri D. D., Nottingham J. F., Lawry J., Dundas S. A. C. Silver-Binding Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Benign and Malignant Breast Lesions: Correlation with Ploidy and Growth Phase by DNA Flow Cytometry. J Pathol, 1989, London, 157, 307-13.

Hernandez-Verdun D. The Nucleolar Organizer Regions. Biol Cell, 1983, France, 49, 3, 191-202.

Homann N. Härkkäinen P., Koivisto T., Nosova T., Jokelainen K., Salaspuro M. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. Journal of the National Cancer Institute, 1997, 89, 22, 1692-7.

Homann N., Tillonen J., Rintamäki H., Salaspuro M., Lindqvist C., Meurman J. H. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. Oral Oncology, 2001, 37, 2, 153-58.

Liberman D. N. Efeito da exposição ao álcool na distribuição periodontal em ratos. Dissertação de Mestrado, 2009, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Maier H., Weidauer H., Zöller J., Seitz H. K., Fientje M., Mall G., Born I. A. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. Alcoholism: Clinical and Experimental Research, 1994, 18, 2, 387-97.

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, 1995, 113, 11, 157-60.

Maito F. D. M., Rados P. V., Sant'Ana Filho M., Barbachan J. J., Quadros O. Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of or topical exposure to alcohol. Alcohol, 2003, 31, 1-2, 25-30.

Martinez M., Martinez E. F., Da Cunha M. R., Segatelli T. M., Pinheiro P. F. F., Almeida C. C. D. Morphological effects on the hard palatine mucosa of *Calomys callosus* submitted to experimental chronic alcoholism. Journal of Submicroscopic Cytology Pathol, 2002, 34, 1, 77-83.

Martinez M., Martinez F. E., Watanabe I. Morphological changes on the hard palatine mucosa of rats (*Rattus Norvegicus Albinus*) after chronic alcohol consumption. Journal Submicroscopic Cytology Pathology, 1998, 30, 3, 379-84.

Mascres C., Joly J. G. Histochemical and ultrastructural study of the rat oral mucosa, after chronic administration of alcohol. Journal de Biologie Buccale, 1981, 9, 3, 279-95.

Mourad, W. A. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in Breast Carcinoma. Cancer, 1992, New York, 69, 7, 1739-44.

Ogden G. R., Wight A. J., Rice P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. Journal of Oral Pathology and Medicine, 1999, 28, 5, 216-20.

Oliveira M. G., Lauxen I. S., Neto M. M., Rados P. V., Jaeger F., Kaize, M. R., Sant'Ana Filho, M. Tongue Squamous Cell Carcinoma: Relationship Between Argyrophilic Nucleolar Organizer (AgNORs) and Histopathologic Grading. Applied Cancer Research, 2005, São Paulo, 25, 1, 20-4.

Paiva R. L., Sant'Ana Filho M., Bohrer P. L., DA Silva I. S., Rados P. V. AgNOR quantification in cells of normal oral mucosa exposed to smoking and alcohol: A cytopathology study. Anal Quant Cytol Histol. 2004, 26, 175-80.

Pich, A.; Chiusa, L.; Margaria, E. Prognostic Relevance of AgNORS in Tumor. Pathology Micron, 2000, Oxford, 31, 133-41.

Ploton D., Menager P., Jeannesson P., Himber G., Pigeon F., Adnett J.J. Improvement in the Staining and in the Visualization of the Argyrophilic Proteins of the Nucleolar Organizer Regions at the Optical Level. Histochem. J. 1986, London, 18, 1. 5-14.

Ray J., Chattopadhyay A., Kaplan, D. Usefulness of AgNOR Counts in Diagnosing Epithelial Dysplasia. J Oral Pathol Med. 2003, Copenhagen, 32, 2, 71-6.

Saafeld V. S., Silva M. R. A. Prevalência do alcoolismo em cuidado primário à saúde. Pesqui. Méd. 1993. Porto Alegre. 27, 1, 5-9.

Sanfelice J. C., Padilha D. M. P., Sant'ana Filho M. Morphological changes in epithelium of the tongue of mice exposed to 40° GL alcohol solution. Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre, 2003, 44, 1, 3-14.

Sano K., Takahashi H., Fujita S, Inokuchi T., Pe M. B., Okabe H., Tsuda N. Prognostic Implication of Silver-Binding Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Oral Squamous Cell Carcinoma. J Oral Pathol Med, 1991, Copenhagen, 20, 2, 53-6.

Slomiany B. L., Piotrowski E., Slomiany A. Induction of buccal mucosal apoptosis with chronic alcohol ingestion. Biochemical and Molecular Biology International, 1998, 44, 2, 381-9.

Simanowski U.A., Suter P., Russell R.M., Heller M., Waldherr R., Ward R. Enhancement of ethanol induced rectal mucosal hyper regeneration with age in F344 rats. Gut. 1994; 35:1102- 6.

Simanowski U.A., Stickel F., Maier H., Gartner U., Seitz H.K. Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis. Alcohol. 1995; 12:111-5.

Squier C. A., Cox, P., Hall, B. K. Enhanced Penetration of Nitrosornicotine Across Oral Mucosa in the Presence of Ethanol. J. Oral Pathol. 1986, Copenhagen, 15, 5. 276-79.

Treré D. AgNOR Staining and Quantification. Micron, 2000, Oxford, 31, 127-131.

Valentine J. A., Scott J., West C.R., St. Hill C. A. A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. Journal of Oral Pathology, 1985, 14, 8, 654-65.

Wah, P. N. Tipos Histológicos de Tumores Orales y Orofaringeos. 1971, Gnebra: Organización Mundial de La Salud.

Xie X., Clausen O. P. F., Sudbö J., Boysen M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. Cancer, 1997. 79, 11, 2200-208.

Xie X., Angelis P. de, Clausen O. P. F., Boysen M. Prognostic Significance of Proliferative and Apoptotic Markers in Oral Tongue Squamous Cell Carcinomas. Oral Oncol, 1999, Oxford, 35, 502-9.

**ÁLCOOL E PROLIFERAÇÃO CELULAR: AVALIAÇÃO EM
LÍNGUA DE RATOS EXPOSTOS AO CONSUMO DE ETANOL
A 5%**

O presente artigo está formatado de acordo com as normas da revista:
ALCOHOLISM: CLINICAL AND EXPERIMENTAL RESEARCH

1 Introdução

O álcool está presente em uma série de soluções, como xaropes, colutórios e bebidas, a população está bastante exposta aos seus efeitos, principalmente em função do consumo de bebidas alcoólicas (SAALFELD, SILVA, 1993). A cerveja, bebida alcoólica bastante popular e consumida no Brasil, possui concentração média de 6% de etanol, o que leva ao interesse pela pesquisa.

Com relação ao efeito do álcool isolado, estudos mostraram aumento da proliferação celular em mucosas de animais submetidos à ingestão crônica de álcool (SIMANOWSKI *et al.*, 1994; SIMANOWSKI *et al.*, 1995; MAITO *et al.*, 2003; SANFELICE *et al.*, 2003; CARRARD *et al.*, 2004).

Esse grupo de pesquisa (MAITO *et al.*, 2003; SANFELICE *et al.*, 2003; CARRARD *et al.*, 2004) tem estudado os efeitos do álcool em humanos e animais. Pesquisando em concentração de 40% de etanol foi observado que a proliferação celular aumenta na camada suprabasal da mucosa da língua, tanto no dorso como no ventre, a partir de 6 meses de ingestão crônica, e que antes deste tempo não há alteração na proliferação celular estatisticamente significativa.

Com relação ao efeito do álcool na espessura epitelial, os achados de Inchausti (2009) concordam com os de Maier *et al.* (1994) e de Sanfelice *et al.* (2003) que observaram menor espessura epitelial em animais submetidos à ingestão de álcool, quando comparados aos controles, em se tratando de observação com mais de 6 meses. Sendo provável que o tempo de ingestão de álcool determine a menor espessura observada por esses autores.

Como recurso tem-se usado a técnica de AgNOR, que são proteínas relacionadas ao nucléolo que têm afinidade pela prata, cuja quantidade aumenta em células com maior atividade proliferativa (DERENZINI *et al.*, 2004). Diferentemente da maioria dos marcadores de proliferação, que indicam se uma célula está ou não se dividindo, a técnica da AgNOR permite avaliar também a velocidade de proliferação (DERENZINI *et al.*, 2000; DERENZINI *et al.*, 2004).

2 Materiais e Métodos

Neste estudo foram utilizados os blocos produzidos pela parte experimental da dissertação do Diego Nique Liberman, em 2009, no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, defendida em dezembro de 2009.

O tamanho da amostra baseou-se em outros estudos como avaliação de dano pelo consumo de etanol (FREEDMAN E SHKLAR, 1978; MAIER *et al.*, 1994; KALENDER *et al.*, 2004; CAMPOS *et al.*, 2005; GUMUS *et al.*, 2005).

A amostra consiste de 30 ratos Wistar, com idades entre 45-60 dias, que foram divididos em 2 grupos (teste e controle) por meio de randomização estratificada em relação ao peso, aferido no início do estudo. Os animais foram alocados em seis caixas-moradias de plástico dentro do biotério central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e permaneceram em um ambiente climatizado a uma temperatura que variou de 18 a 22°C. Foi respeitado um ciclo alternativo claro/escuro de 12 horas e foi oferecido a ambos os grupos uma dieta *ad libitum* contendo ração e líquido, com ou sem a presença de etanol. Após divididos em número de 5 animais por caixa, os mesmos receberam numeração de 1 a 5 realizadas através de riscos com caneta marcadora permanente no rabo e as caixas receberam identificação dentro dos grupos controle (C1, C2 e C3) e teste (T1, T2 e T3).

Para os ratos do grupo teste (Etanol), foi administrada uma solução diariamente contendo etanol numa concentração de 5% diluído em água destilada ao longo de 9 semanas. Para o segundo grupo (Controle) foi administrada apenas a água destilada. O tratamento em ambos os grupos ocorreu igualmente sendo que os dois grupos receberam, juntamente com o líquido, a mesma ração como complemento da dieta. Para a obtenção de líquido contendo etanol numa concentração de 5%, foi utilizada uma proveta de 500ml onde foi misturado 25ml de álcool etílico 100% PA (Vetec Química Fina Ltda.) a 475ml de água destilada.

Com o período experimental encerrado, os animais foram sacrificados por meio de câmara de Dióxido de Carbono. Foi coletada a língua e a peça foi cortada no sentido longitudinal, os fragmentos foram fixados em formalina tamponada a 10% por um período de 24h. Após esse período os fragmentos seguiram o processamento histotécnico e incluídos em parafina histológica. A inclusão das

peças de língua respeitou a orientação transversal, para que se pudesse ver toda a estratificação epitelial e a relação entre tecido epitelial e conjuntivo (MAITO *et al.*, 2003; SANFELICE *et al.*, 2003).

Foram obtidos 3 cortes de 4 μ m (Micrótomo LEICA – modelo RM 2155), um foi corado por Hematoxilina Eosina (HE), outro submetido à técnica de impregnação pela prata para evidenciação das AgNORs.

A técnica de AgNOR foi realizada no laboratório de Histopatologia Prof. Dr. J. J. Barbachan. As lâminas foram identificadas com o número de registro do paciente, evitando que o examinador identificasse o grupo ao qual o paciente pertencia durante a análise; as lâminas foram submetidas à técnica de impregnação pela prata conforme o protocolo descrito por Ploton *et al.* (1986). A captura das imagens ocorreu imediatamente após a montagem final das lâminas, entre 1 a 4h após a referida montagem. Para a avaliação quantitativa, as imagens capturadas foram visualizadas em aumento de 1000 x, utilizando o óleo de imersão Olympus (Olympus Optical CO. LTD., Japan). Foram capturadas imagens consecutivas de toda a extensão do epitélio do ventre e do dorso lingual, através de uma câmara de vídeo modelo Q-Color5™ (Olympus America, Inc., Center Valley, PA, USA) acoplada a um microscópio binocular modelo CX41RF (Olympus Latin America, Inc., Miami, FL, USA) e a um computador modelo Dimension 5150 (Dell Inc., Eldorado do Sul, RS, Brasil), utilizando o software Image Pro-Plus 5.1 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japão).

Foi considerada a camada basal aquela na qual as células tinham pelo menos uma porção da sua membrana celular em contato com o tecido conjuntivo. Foram consideradas da camada suprabasal as células acima da camada basal, exceto aquelas que apresentavam o achatamento típico das células superficiais. Foi utilizado este critério devido à proliferação celular ser característica na camada basal, sendo as camadas suprajacentes, responsáveis pelo processo de maturação ou diferenciação celular, e a proliferação menos presente (SQUIER, FINKELSTEIN, 2001). Quando houve dúvida quanto à camada de origem de uma célula, optou-se pela sua exclusão do estudo. Também foram excluídas células com núcleos sobrepostos ou dobrados e áreas com presença de artefatos. Os pontos associados foram contados como um só, seguindo o método padronizado por Crocker, Boldy, Egan (1989). A camada superficial não foi analisada devido a presença dos lisossomos que, por possuírem a enzima fosfatase ácida, permitem

impregnação pela prata não relacionada às AgNORs (MASCRES, JOLY, 1981). A partir da quantificação das AgNORs foi calculado o índice de mAgNORs sendo as AgNOR quantificadas divididas pelo número de células (50). Também foi calculado o $p > 1$ AgNOR, $p > 2$ AgNOR, $p > 3$ AgNOR, $p > 4$ AgNOR, isto é, o número de células com mais que 1, 2, 3 e 4 AgNOR.

Foi realizada uma calibração intra examinador durante o estudo, a cada 10 lâminas analisadas 1 foi reavaliada. O Kappa foi considerado aceitável com índices de 0.7 a 1. O cegamento foi realizado por um profissional do Laboratório de Histopatologia Prof. Dr. J. J. Barbachan – Faculdade de Odontologia – UFRGS, que ao receber o material coletado realizou o registro do mesmo, a partir deste momento o material recebeu um código de registro impossibilitando que o examinador soubesse a que grupo pertencia o material durante a captura das imagens e avaliação.

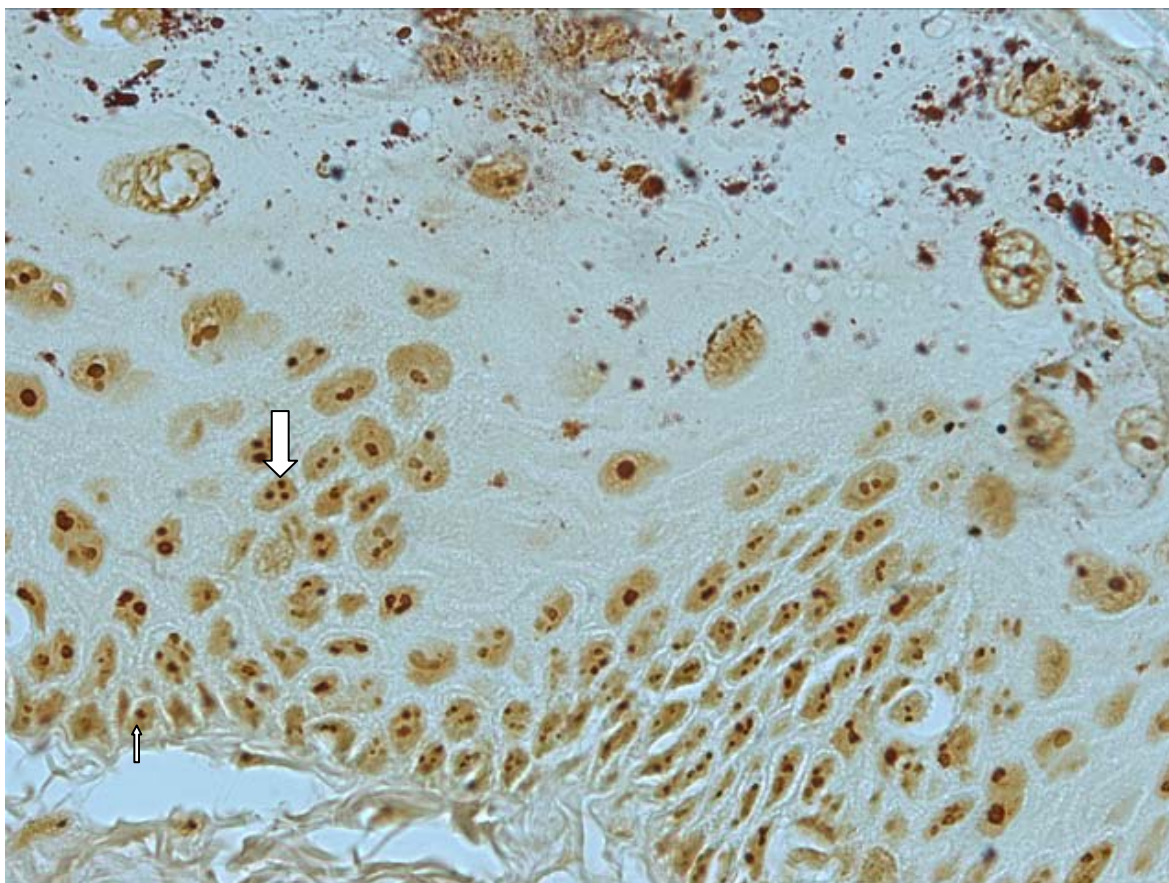


Figura 1 – Fotomicrografia da mucosa lingual de animal do grupo controle, impregnada pela prata para observação das AgNORs. Observa-se células da camada basal (seta estreita ascendente) e células da camada suprabasal (seta larga descendente). Técnica de impregnação pela prata – Aumento original de 1000x.

Análise estatística

A análise dos dados teve como abordagem inicial a investigação da distribuição dos dados, buscando identificar quais apresentaram uma distribuição normal (simétrica) através do teste de *Kolmogorov Smirnov*.

Para a investigação de diferenças entre as variáveis nas diferentes regiões anatômicas (mucosa do dorso e do ventre), entre os grupos, foi utilizado o teste Mann-Whitney.

Para a investigação de diferenças entre as variáveis dorso e ventre, dentro dos grupos (Teste e Controle), foi utilizado o teste Wilcoxon.

Os dados receberam tratamento estatístico utilizando-se o software *SPSS 13.0 (Statistical Package to Social Sciences for Windows)* onde, para critérios de decisão, foi adotado o nível de significância (α) de 5%.

3 Resultados

COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPO 1(CONTROLE) e 2(ÁLCOOL) – mAgNOR e pAgNOR (CELLEGARI-JAQUES, 2003)

O teste de Kolmogorov-Smirnov demonstrou que a amostra não apresentou distribuição normal (distribuição assimétrica). O Teste de Mann-Whitney, mostrou não haver diferença significativa entre Dorso grupo Controle X Dorso grupo Teste na camada basal, Dorso grupo Controle X Dorso grupo Teste camada suprabaasal. Demonstrou ainda não haver diferença significativa entre Ventre grupo Controle X Ventre grupo Teste, camada basal, Ventre grupo Controle X Ventre grupo Teste, camada suprabaasal. Tabela 1 e 2.

Tabela 1: Comparação das variáveis Dorso e Ventre - mAgNOR

	Grupos		P
	Grupo controle (n=15)	Grupo álcool (n=15)	
Dorso camada Basal mAgNOR			
Média ± desvio padrão	2,32 ± 0,31	2,21 ± 0,35	0,223
Mínimo – Máximo	1,92 – 3,10	1,80 – 3,06	
Dorso camada Supra mAgNOR			
Média ± desvio padrão	1,89 ± 0,32	1,93 ± 0,23	0,482
Mínimo – Máximo	1,42 – 2,70	1,58 – 2,42	
Ventre camada Basal mAgNOR			
Média ± desvio padrão	2,40 ± 0,26	2,38 ± 0,29	0,579
Mínimo – Máximo	1,94 – 2,74	1,92 – 2,92	
Ventre camada Supra mAgNOR			
Média ± desvio padrão	2,04 ± 0,23	2,06 ± 0,34	0,832
Mínimo - Máximo	1,68 – 2,44	1,46 – 2,72	

Tabela 2: Comparação das variáveis Dorso e Ventre - pAgNOR

	Grupos		p
	Grupo controle (n=15)	Grupo álcool (n=15)	
Dorso camada Basal pAgNOR			
Média ± desvio padrão	74,67 ± 7,12	72,93 ± 11,78	0,504
Mínimo - Máximo	64 – 88	56 – 96	
Dorso camada Supra pAgNOR			
Média ± desvio padrão	56,93 ± 14,04	60,27 ± 9,07	0,673
Mínimo – Máximo	32 – 76	46 – 76	
Ventre camada Basal pAgNOR			
Média ± desvio padrão	76,80 ± 7,95	75,73 ± 7,13	0,943
Mínimo – Máximo	62 – 94	62 – 84	
Ventre camada Supra pAgNOR			
Média ± desvio padrão	63,73 ± 10,19	63,47 ± 10,01	0,976
Mínimo - Máximo	42 – 84	40 – 80	

COMPARAÇÃO ENTRE O DORSO E O VENTRE GRUPO CONTROLE E TESTE, OBSERVAÇÃO DA mAgNOR e pAgNOR (CELLEGARI-JAQUES, 2003)

O teste de Kolmogorov-Smirnov apresentou uma distribuição não normal (distribuição assimétrica). Foi aplicado o Teste Não paramétrico de Wilcoxon e foi observado Dorso X Ventre nas camadas basal e suprabasal, comparações intra grupo, onde não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as referidas regiões. Tabela 3.

Tabela 3: Comparação entre as variáveis, Dorso X Ventre, dentro do próprio grupo (controle e álcool)

	Grupo controle		Grupo álcool	
	mAgNOR (n=15)	pAgNOR (n=15)	mAgNOR (n=15)	pAgNOR (n=15)
Dorso Basal x Ventre Basal	0,272	0,400	0,078	0,432
Dorso Supra x Ventre Supra	0,233	0,233	0,221	0,396

2.1. COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPO 1 e 2 – pAgNOR

Através do teste de Kolmogorov-Smirnov os dados apresentaram distribuição assimétrica.

Através do Teste de Mann-Whitney verifica-se a diferença entre os grupos.

Para pAgNOR > 1, pAgNOR > 2, pAgNOR > 3, pAgNOR >4, verifica-se que não há diferença estatisticamente significativa para as camadas suprabasal e basal, tanto no dorso como no ventre lingual, quando comparados os grupos Teste com o Grupo Controle.

Tabela 1: Comparação das variáveis Dorso e Ventre - pAgNOR, Entre os grupos

	Grupos		p
	Grupo Controle (n=15)	Grupo Álcool (n=15)	
Dorso Basal PagNor>1			
Média ± desvio padrão	74,67 ± 7,12	72,93 ± 11,78	0,504
Mínimo – Máximo	64 – 88	56 – 96	
Dorso Supra PagNor>1			
Média ± desvio padrão	56,93 ± 14,04	60,27 ± 9,07	0,673
Mínimo – Máximo	32 – 76	46 – 76	
Ventre Basal PagNor>1			
Média ± desvio padrão	76,80 ± 7,95	75,73 ± 7,13	0,943
Mínimo – Máximo	62 – 94	62 – 84	
Ventre Supra PagNor>1			
Média ± desvio padrão	63,73 ± 10,19	63,47 ± 10,01	0,976
Mínimo - Máximo	42 – 84	40 – 80	
Dorso Basal PagNor>2			
Média ± desvio padrão	38,27 ± 11,71	35,07 ± 13,83	0,539
Mínimo – Máximo	22 – 62	12 – 62	
Dorso Supra PagNor>2			
Média ± desvio padrão	21,47 ± 10,29	23,60 ± 9,83	0,436
Mínimo – Máximo	6 – 46	10 – 42	
Ventre Basal PagNor>2			
Média ± desvio padrão	42,40 ± 10,01	40,40 ± 10,18	0,567
Mínimo – Máximo	22 – 60	22 – 56	
Ventre Supra PagNor>2			
Média ± desvio padrão	27,20 ± 9,16	29,07 ± 13,75	0,775
Mínimo – Máximo	12 – 44	6 – 52	
Dorso Basal PagNor>3			
Média ± desvio padrão	15,47 ± 9,84	10,53 ± 8,93	0,089
Mínimo – Máximo	2 – 42	0 – 32	
Dorso Supra PagNor>3			
Média ± desvio padrão	7,87 ± 7,31	7,47 ± 5,37	0,967
Mínimo – Máximo	0 – 30	2 – 22	
Ventre Basal PagNor>3			
Média ± desvio padrão	16,00 ± 7,93	16,00 ± 9,07	0,838

Mínimo – Máximo	4 – 28	6 – 34	
Ventre Supra PagNor>3			
Média ± desvio padrão	10,13 ± 6,07	10,40 ± 8,79	0,902
Mínimo – Máximo	2 – 22	0 – 32	
Dorso Basal PagNor>4			
Média ± desvio padrão	4,47 ± 5,83	2,64 ± 4,19	0,838
Mínimo – Máximo	0 – 22	0 – 16	
Dorso Supra PagNor>4			
Média ± desvio padrão	3,20 ± 3,84	2,13 ± 3,07	0,367
Mínimo – Máximo	0 – 14	0 – 10	
Ventre Basal PagNor>4			
Média ± desvio padrão	4,93 ± 4,06	5,47 ± 4,98	0,838
Mínimo – Máximo	0 – 14	0 – 18	
Ventre Supra PagNor>4			
Média ± desvio padrão	2,80 ± 2,81	3,47 ± 4,75	1,000
Mínimo – Máximo	0 – 8	0 – 18	

Tabela 2: Comparação das variáveis Dorso e Ventre (INTRA) dentro do grupo controle e teste

Foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon.

Com relação aos resultados apresentados no grupo Controle, bem como no grupo Teste, quando observamos as camadas basal e suprabasal do ventre comparado com as mesmas camadas do dorso, verifica-se os resultados apresentados em relação ao $p_{AgNOR} > 1$, $p_{AgNOR} > 2$, não há diferença estatisticamente significativa entre essas camadas dentro de cada grupo.

Com relação ao $p_{AgNOR} > 3$ no grupo controle não há diferença estatisticamente significativa para as camadas basal e suprabasal quando comparados dorso com o ventre, bem como no grupo teste não há diferença quando comparados dorso e ventre na sua camada suprabasal, entretanto, na camada basal do grupo teste, quando comparados o ventre com o dorso, observa-se diferença estatisticamente significativa, $p = 0,03$, $p < 0,05$.

Com relação ao $p_{AgNOR} > 4$ no grupo controle não há diferença estatisticamente significante para as camadas basal e suprabasal quando comparados dorso com o ventre, bem como no grupo teste não há diferença quando comparados dorso e ventre na sua camada suprabasal, entretanto, na camada basal do grupo teste, quando comparados o ventre com o dorso, observa-se diferença estatisticamente significante, $p = 0,013$, $p < 0,05$.

	Grupo Controle (n=15)	Grupo Teste (n=15)
Dorso Basal>1 x Ventre Basal>1	0,400	0,432
Dorso Supra >1 x Ventre Supra>1	0,233	0,396
Dorso Basal>2 x Ventre Basal>2	0,330	0,172
Dorso Supra >2 x Ventre Supra>2	0,148	0,172
Dorso Basal>3 x Ventre Basal>3	0,582	0,030
Dorso Supra >3 x Ventre Supra>3	0,243	0,247
Dorso Basal>4 x Ventre Basal>4	0,155	0,013
Dorso Supra >4 x Ventre Supra>4	0,936	0,499

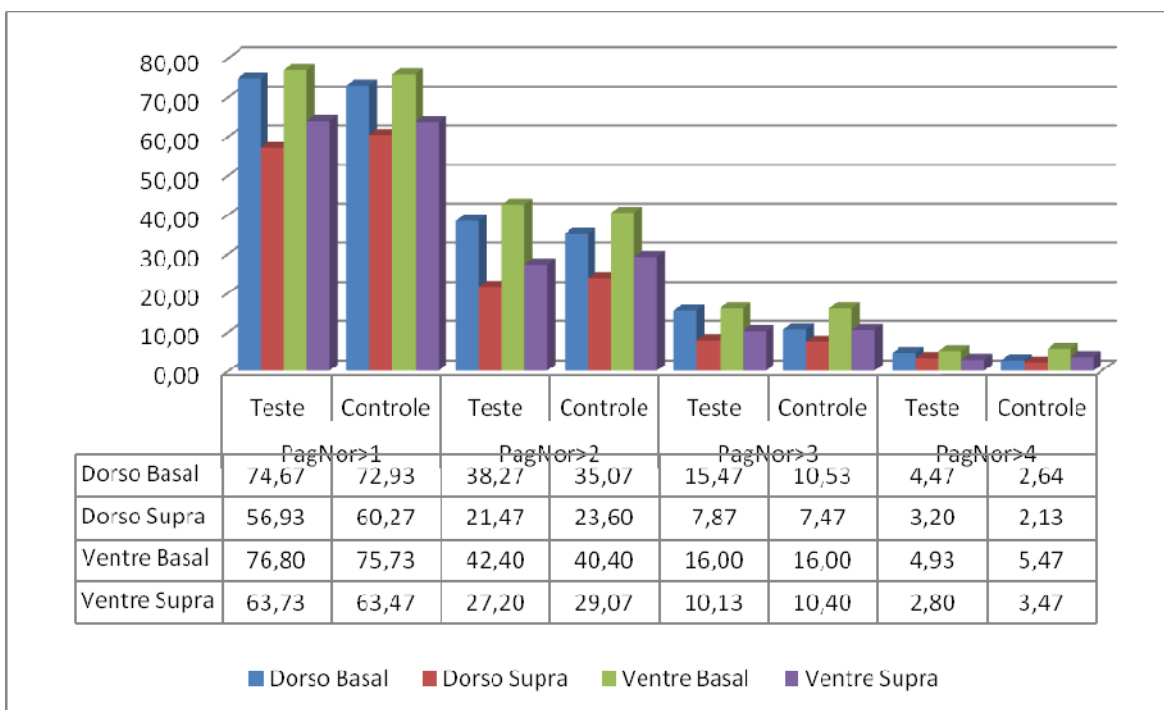


Gráfico 1: Análise comparativa das médias do pAgNOR quando >1, >2, >3 e >4.

Entre o grupo Controle e Teste.

4 Discussão

Neste estudo, observando as tabelas 1 e 2, observa-se que a atividade proliferativa não se modificou entre os grupos, teste e controle, esse fato pode ser relacionado ao tempo do estudo, 9 semanas, onde concorda com os resultados de Carrard et al. (2004), em relação ao grupo ingestão de álcool, a contagem do número de AgNOR revelou uma redução entre o período inicial e os 6 meses. Esta redução pode ser um indício de sofrimento celular, que num primeiro momento provoca uma diminuição na sua capacidade de proliferar. Posteriormente, entre 6 e 12 meses, de forma reativa, ocorre um aumento da proliferação. Estes resultados confirmam as conclusões de Maito et al. (2003), onde relatam que estudos em pequenos intervalos de tempo com o álcool podem não revelar o seu real efeito.

Este trabalho concorda com o trabalho de Xie et al. (2007) que descreve o uso do mAgNOR como um marcador que dilui os resultados, enquanto o pAgNOR declara com especificidade o ritmo proliferativo do tecido estudado.

Nosso trabalho observou que houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos o ventre (não ceratinizado) e o dorso (ceratinizado) na camada basal do grupo teste com relação ao pAgNOR > 3 e pAgNOR > 4. Este resultado sugere que a velocidade de proliferação está aumentada, fato que pode ser explicado pelos resultados descritos por Squier, Cox e Hall (1996) e Du et al. (2000) onde, utilizando concentração de 5% de etanol, encontraram permeabilidade aumentada na mucosa do assoalho bucal quando comparado a outras concentrações (Estudos *in vitro*). Neste contexto, pode sugerir que a concentração do álcool influencia no comportamento proliferativo por meio do aumento da permeabilidade.

A camada basal foi a que mostrou diferença estatisticamente significativa e pode ser explicado pois em condições fisiológicas está em constante proliferação, logo, a ação de um agente promotor (etanol) a modifica mais rapidamente. Pode se especular que com o passar do tempo de exposição esta diferença seria encontrada também na suprabasal do epitélio não ceratinizado, concordando com os achados de Maito et al. (2003) e de Carrard et al. (2004) que mostraram alterações somente após seis meses de experimento. Ressalte-se ainda que os experimentos dos autores anteriormente citados foram em epitélio do dorso

somente, o que vai ao encontro dos nossos resultados, onde num curto período deste experimento, apenas o ventre mostrou alterações.

Paiva et al. (2004) observou maior ritmo de proliferação nos indivíduos que estiveram expostos ao álcool há mais de seis meses, e este evento foi semelhante em mucosa ceratinizada e não ceratinizada. O instrumento de análise foi a citopatologia, pode se explicar esses achados devido ao instrumento de coleta onde os raspados obtêm células da camada suprabasal e esta já está alterada após seis meses de exposição, independente do tipo de epitélio.

Nossos resultados sugerem, comparando com os trabalhos de Maito et al. (2003), Sanfelice et al. (2003) e Carrard et al. (2004), que após a exposição por períodos longos, a concentração de etanol parece não interferir nas alterações de proliferação dos ceratinócitos. Além disso, este efeito independe do tipo de mucosa, ceratinizada ou não. Passado determinado tempo, pode-se pensar que a concentração de etanol não tem significado expressivo nas alterações de proliferação celular.

5 Conclusão

Conclui-se que a exposição ao etanol a 5% provoca alterações de proliferação no modelo estudado.

Agradecimentos

A PROF/CAPES e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo equipamento de captura e software, presente na Unidade de Morfometria e Histometria, FO-UFRGS, PROAP 04/2005 n' do Processo 0410882.

Referências

- Campos SC, Moreira DA, Nunes TD, Colepicolo P, Brigagao MR (2005) Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis. *Arch Oral Biol* 50(7):661-8.
- Carrard VC, Filho MS, Rados PV, Chaves AC, Lauxen Ida S (2004) Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. *Alcohol* 34(2-3):233-8.
- Derenzini M, Treré D, Pession A, Govoni M, Sirri, V, Chieco P (2000) Nucleolar Size Indicates the Rapidity of Cell Proliferation in Cancer Tissues. *J Pathol, London*, 191(2) 181-86.
- Derenzini, M, Ceccarelli, C, Santini, D, Taffurelli M, Treré (2004) D. The Prognostic Value of the AgNOR Parameter in Human Breast Cancer Depends on the pRB and p53 Status. *J Clin Pathol, London*, 57, 755-61.
- Du, X. et al. (2000) Penetration of N-Nitrosornicotine (NNN) Across Oral Mucosa in the Presence of Ethanol and Nicotine. *J. Oral Pathol. Med. Copenhagen*, 29(2)80-85.
- Freedman A, Shklar G (1978) Alcohol and hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 46(6):794-805.
- Goldin J R, (1997) Pesquisa em Saúde Leis, Normas e Diretrizes. Porto Alegre. GSI/HPA 156p.
- Gumus E, Solakoglu S, Mutus R, Altay B, Kiziler AR, Miroglu C (2005) Effect of acute alcohol intake on prostate tissue and serum PSA-like protein levels in rats. *Urol Int* 75(1):50-6.
- Homann N. et al. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa (1997) *Journal of the National Cancer Institute*. 89(22)1692-97.
- Inchausti A J (2009) Survivin e sua relação com álcool e vitamina E em epitélio lingual de ratos. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Institute of Laboratory Animal Research COLS, National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press, Washington, D.C.:140.
- Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Acikgoz F (2004) Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology* 202(3):227-35.
- Liberman, D. N. (2009) Efeito da exposição ao álcool na distribuição periodontal em ratos. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

- Maier H, Weidauer H, Zoller J, Seitz HK, Flentje M, Mall G, Born IA (1994) Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res* 18(2):387-91.
- Maito FL, Rados PV, Filho MS, Barbachan JJ, Quadros O (2003) Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of, or topical exposure to, alcohol. *Alcohol* 31(1-2):25-30.
- Paiva R L, Santàna Filho M, Bohrer P L, DA Silva I S, Rados P V (2004) AgNOR quantification in cells of normaol oral mucosa exposed to smoking and alchol: A citopathology study. *Anal Qunat Cytol Histol* 26 175-80.
- Saafeld V S, Silva M R A (1993) Prevalência do alcoolismo em cuidado primário à saúde. *Pesqui. Méd. Porto Alegre.* 27(1) 5-9.
- Sanfelice JCP, D.M.P, Sant'Ana Filho, M. (2003) Alterações morfológicas em epitélio lingual de camundongos expostos ao álcool etílico a 40o GL. . *R. Fac. Odontol.* 44(1):3-14.
- Simanowski UA, Stickel F, Maier H, Gartner U, Seitz HK (1995) Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis. *Alcohol* 12(2):111-5.
- Simanowski UA, Suter P, Russell RM, Heller M, Waldherr R, Ward R, Peters TJ, Smith D, Seitz HK (1994) Enhancement of ethanol induced rectal mucosal hyper regeneration with age in F344 rats. *Gut* 35(8):1102-6.
- Squier C A, Cox P, Hall B K (1986) Enhanced Penetration of Nitrosonornicotine Across Oral Mucosa in the Presence of Ethanol. *J. Oral Pathol. Copenhagen* 15(5)276-279.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo concluiu-se que houve diferença estatisticamente significativa no grupo álcool, na camada basal, baseado na quantificação de pAgNOR > 3 e >4. Os resultados sugerem que, após a exposição por períodos longos, a concentração de etanol parece não interferir nas alterações de proliferação dos ceratinócitos. Além disso, este efeito independe do tipo de mucosa, ceratinizada ou não.