

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

QUANTIFICAÇÃO DAS AgNORs EM EPITÉLIO LINGUAL
DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À APLICAÇÃO TÓPICA E
INGESTÃO DE ETANOL A 40° GL

Vinicius Coelho Carrard

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

Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho
ORIENTADOR

Porto Alegre-RS, Agosto de 2003.

O aspecto mais triste da vida
de hoje é que a ciência ganha
em conhecimento mais rapidamente
que a sociedade em sabedoria.

Isaac Asimov

AGRADECIMENTOS

A todos que, de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho. Ele é fruto do esforço de muitas pessoas, não sendo possível citar todas pelo nome, independente da sua importância.

Aos meus pais, Sérgio e Viviane, que sempre apoiaram as minhas escolhas, dando todas as condições para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus irmãos, Michel e Christian, que souberam entender meu humor instável durante esses 2 anos e pela ajuda que me deram quando eu precisei.

A minha namorada, Alessandra, que participou da confecção do trabalho em todas as suas fases, sempre exigente e incansável, por todo apoio que me tem dado nesses quase 5 anos de convivência e a sua família, que me acompanhou com muito carinho.

Ao Prof. Manoel Sant'Ana Filho, meu orientador, por todos ensinamentos repassados, muitas vezes de uma forma não tão ortodoxa, pelo exemplo de seriedade científica e pela amizade e confiança que a mim dispensou.

Ao Prof. Pantelis, pelo exemplo de dedicação às atividades docentes, e pela forma generosa e humana como me acolheu já como interno da disciplina de Patologia Bucal.

Ao Prof. Barbachan e ao Prof. Bagé, criadores da equipe da Patologia Bucal, pela disponibilidade e consternação que demonstraram diante dos problemas que surgiram.

À Isabel, não só pelo exemplo de competência e pelos conhecimentos que nos passou com uma paciência infindável, mas por todo o carinho, o apoio e o reconhecimento a mim.

À Prof. Anna Cecília, pelos conselhos, pelas conversas científicas e pelo exemplo de humildade.

Aos colegas de Mestrado e Doutorandos, especialmente Ricardo, Cristiano, Paula, Cristina, Márcia e Cristiane, pelo que com eles pude aprender durante esses dois anos.

Aos professores e amigos, Jorge Omar e Fabiana, por tudo o que com eles aprendi, capacitando-me ao ingresso no Mestrado.

À equipe técnica da Patologia, Adriana, Verônica, Rosimary, Marina, Bianca, Jaqueline, por me atenderem com simpatia sempre que eu as importunei.

Aos colegas, Fábio, Christine, Tatiana, Júlio e Clélea, mestres em Patologia Bucal da turma passada, pela forma afetuosa com que me acolheram quando comecei o Internato.

Às funcionárias da biblioteca, Norma, Eloísa e Mailing, pela dedicação com que atendiam aos meus pedidos quase semanais.

Alunos desta faculdade, turma ATO 04/2, por terem sido compreensivos ao assistirem às minhas aulas e por terem me convencido de que não foi tão ruim assim.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade proliferativa das células epiteliais da mucosa lingual de camundongos frente à ação do etanol a 40° GL, baseado na contagem e mensuração das áreas das AgNORs através da técnica de impregnação pela prata. Foram utilizados 32 camundongos com 2 meses de vida, divididos em três grupos. Os grupos controle e aplicação tópica receberam ração padrão e água comum, sendo o último submetido ainda a 2 aplicações tópicas semanais de 1ml de etanol a 40 °GL. No grupo ingestão a água foi substituída por etanol na mesma graduação alcoólica. Os animais foram biopsiados no centro do dorso da língua, no início, aos 6 e 12 meses de experimento, e as peças submetidas ao processamento de rotina para inclusão em parafina. Fizeram-se cortes histológicos de 4 µm submetidos à técnica de impregnação pela prata. Foram avaliadas a contagem e área das AgNORs de 50 células da camada basal e 50 da camada suprabasal. Os resultados foram comparados pelo teste da análise da variância (ANOVA) e teste post-hoc da mínima diferença significativa (LSD). Observou-se um aumento da média do número e da área das AgNORs na camada suprabasal aos 12 meses, no grupo ingestão ($p < 0,05$). Conclui-se que a ingestão de etanol a 40° GL provoca um aumento da proliferação celular na mucosa bucal.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the proliferative activity of lingual mucosal cells from mice exposed to ethanol based in quantification of number and area of AgNORs. Two months old 32 CF1 mice was separated into three groups. The control and topic application groups received standard diet and tap water. Mice from the topic application group were also submitted to 1ml of ethanol 40°GL application in the oral cavity twice a week. Tap water was substituted by the same concentration of ethanol in the ingestion group. A biopsy was taken from the middle third of the dorsal tongue in the onset, at 6 and 12 months of experiment. The material was paraffin-embedded. Four micrometers sections was obtained and stained with AgNOR technique. The mean AgNOR counting and area per nucleus was evaluated in 50 cells of the basal layer and 50 cells of the suprabasal layer. The results was compared by ANOVA and post-hoc least significant difference (LSD). There was an increase in the mean number and in the mean area of AgNORS/nucleus in the suprabasal layer at 12 months in the ingestion group ($p < 0.05$). It was concluded that 40° GL ethanol ingestion increases epithelial cells proliferation from dorsal surface of the tongue mucosa.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Fotomicrografia da mucosa lingual de animal do grupo ingestão no início do experimento, impregnada pela prata, para observação das AgNORs. Observa-se a presença do tecido epitelial (E), tecido muscular (M) e camada de ceratina (C) Técnica de impregnação pela prata - Aumento original de 400x..... 40
- FIGURA 2 – Fotomicrografia da mucosa lingual de animal do grupo ingestão no início do experimento, impregnada pela prata, para observação das AgNORs. Observam-se células da camada basal (setas cheias) e células da camada suprabasal (setas vazadas). Técnica de impregnação pela prata - Aumento original de 1000x 40

LISTA DE QUADRO E TABELAS

QUADRO 1 - Distribuição dos blocos analisados dos grupos controle (GC), aplicação tópica (GAT) e ingestão (GI) nos diferentes tempos experimentais, Porto Alegre, 2003.....	34
TABELA 1 - Distribuição das médias e desvios-padrão das contagens do número de AgNORs por núcleo das células da camada basal, nos grupos controle (GC), aplicação tópica (GAT) e ingestão (GI) ao longo do tempo, Porto Alegre, 2003.....	37
TABELA 2 - Distribuição das médias e desvios-padrão das contagens do número de AgNORs por núcleo das células da camada suprabasal, nos grupos controle (GC), aplicação tópica (GAT) e ingestão (GI) ao longo do tempo, Porto Alegre, 2003.....	37
TABELA 3 - Distribuição das médias e desvios-padrão (DP) da mensuração das áreas de AgNORs por núcleo (μm^2) das células da camada basal, nos grupos controle (GC), aplicação tópica (GAT) e ingestão (GI) ao longo do tempo, Porto Alegre, 2003.....	38
TABELA 4 - Distribuição das médias e desvios-padrão (DP) da mensuração das áreas de AgNORs por núcleo (μm^2) das células da camada suprabasal, nos grupos controle (GC), aplicação tópica (GAT) e ingestão (GI) ao longo do tempo, Porto Alegre, 2003.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH (s)-enzima (s) álcool desidrogenase (s)

ANOVA- teste da análise da variância

AgNORs- proteínas argirofílicas associadas às regiões organizadoras nucleolares (marcador de proliferação celular)

ALDH- enzima aldeído-desidrogenase

AP1- proteína ativadora 1

BrdU- bromo-desoxiuridina (marcador imunohistoquímico de proliferação celular)

CCD- charge coupled device (informática)

CF1- linhagem de camundongos

c-jun- proteína c-jun

CO₂- gás carbônico

C23- nucleolina

B23- nucleofosmina

DMBA- dimetil-benzantraceno

DNA- ácido desoxirribonucléico

DP- desvio-padrão

EGF- fator de crescimento epidérmico

EGFR- receptor de fator de crescimento epidérmico

Fase G1- fase Gap 1 do ciclo celular

Fase G2- fase Gap 2 do ciclo celular

Fase S- fase de síntese do ciclo celular

FEPPS- Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

g- grama

GAT- grupo aplicação tópica

GC- grupo controle

GI- grupo ingestão

°GL- graduação alcoólica de Gay Lussac (ml/ml)

H₂O₂-peróxido de hidrogênio

HE-Técnica de coloração da hematoxilina-eosina

H-timidina - timidina radioativa marcada com trítio

KDa- quilodáton

Ki67- antígeno Ki67 (marcador imunohistoquímico de proliferação celular)

LSD- least significant difference (teste da mínima diferença significativa)

Mb- Megabytes (informática)

MHz-megahertz

ml- mililitros

μm^2 - micrômetros quadrados

mM- milimolar

MEOS- sistema microssomal de degradação do etanol

NORs- regiões organizadoras nucleolares

p- indica o valor da probabilidade estatística de erro

P.A.- pró-análisis

PAS- Ácido Periódico de Schiff

PBS- solução salina tamponada

PCNA- antígeno nuclear de proliferação celular (marcador imunohistoquímico de proliferação celular)

Post-hoc- teste de comparações múltiplas

px- pixels

RAM- Random Acces Memory (informática)

RNA- ácido ribonucléico

RNAr- RNA ribossômico

TGF α - fator de crescimento transformante α

3D- indica o uso de imagens em três dimensões

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE QUADRO E TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 EFEITOS DO ETANOL	14
2.2 REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES E A TÉCNICA DE AgNOR	25
3. PROPOSIÇÃO	30
4. METODOLOGIA	31
5. RESULTADOS	37
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO

O etanol tem mostrado a capacidade de modificar as características de normalidade do tecido epitelial que reveste o trato digestivo. Esta fica bastante evidente através de trabalhos, nos quais a ingestão de etanol mostrou relação com alterações do processo de renovação celular da mucosa bucal, assim como das demais mucosas do trato gastrointestinal. Este processo envolve morte, diferenciação e proliferação celular, sendo esta uma característica importante na manutenção da homeostase, pois repõe as células perdidas na superfície pelo processo de descamação (HILL, 1994; SQUIER, FINKENLSTEIN, 2001).

Muitos autores interpretam as variações da espessura epitelial como indicativo de modificações na atividade proliferativa das mucosas. A redução na espessura epitelial frente à ação do etanol, observada por Valentine et al (1985) e Sanfelice (2001), pode ser provocada tanto por diminuição da proliferação celular, como aumento da descamação ou morte de células, de forma que a sua análise isolada tem pouco significado. Se, por um lado, estes autores sugerem uma relação do consumo de etanol com redução da proliferação celular, Maier et al (1994) e Maito (2001) apresentam uma contradição ao revelarem aumento da atividade proliferativa nos seus trabalhos.

AgNORs são proteínas relacionadas ao nucléolo que tem afinidade pela prata, cuja quantidade aumenta em células com maior atividade proliferativa (DERENZINI et al, 1995, 1999, 2000). Diferentemente da maioria dos marcadores de proliferação, que indicam apenas se uma célula está ou não se dividindo, a técnica da AgNOR permite diferenciar, entre as células que estão proliferando, aquelas que o fazem mais rapidamente (QUINN, WIGHT, 1990; DERENZINI, 2000; DERENZINI et al, 2000).

Diante da dúvida, este trabalho se propõe a avaliar a proliferação celular frente à ação do etanol, a partir da técnica de AgNOR, no material produzido por Maito, (2001) e Sanfelice (2001).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EFEITOS DO ETANOL

O etanol é uma molécula presente em uma série de soluções, como xaropes, colutórios e bebidas, sendo freqüente o seu contato com a mucosa da boca e de todo o trato gastrointestinal. A população está bastante exposta aos seus efeitos, principalmente em função do consumo de bebidas alcoólicas (SAALFELD, SILVA, 1993; BERTELLI et al, 1994). Isso permite que o etanol tenha, tanto uma ação direta sobre as mucosas, quanto uma indireta, a partir da sua absorção e distribuição por todos os órgãos, através da circulação sanguínea. Alguns desses órgãos, por estarem alterados, poderiam produzir indiretamente algum dano na boca.

Uma vez ingerido, o etanol começa a ser absorvido imediatamente pela mucosa da boca e, como vapor, pelos alvéolos pulmonares. Mesmo sendo pequena esta quantidade é importante e pode causar dano na mucosa bucal. Entretanto a grande parte da absorção é realizada pela mucosa do estômago e, principalmente, pela do intestino, da mesma forma que a água, por osmose. Em seguida, o etanol é rapidamente canalizado pelo sistema porta até o fígado, onde ocorre, predominantemente, a sua degradação. O etanol é, então, convertido pela enzima álcool-desidrogenase (ADH) em acetaldeído, e este em acetato pela aldeído-desidrogenase (ALDH). A partir daí, o acetato é metabolizado em CO₂ e água. Existem ainda outras rotas de degradação, o sistema microssomal de degradação do etanol (MEOS), situado no retículo endoplasmático dos hepatócitos; e o da catalase, dependente da presença de H₂O₂, que, em termos de quantidade, é menos presente. O MEOS está envolvido também na metabolização de outras drogas, sendo um sistema que aumenta a sua função em alcoolistas crônicos de forma adaptativa. (LIPSCOMB, 1994; JOHNSON, 1995; RIVEROS-ROSAS, JULIAN-SANCHEZ, PIÑA, 1997).

O etanol não é comprovadamente mutagênico, mas o acetaldeído é capaz de provocar alterações, como a quebra da fita de DNA (Ácido desoxirribonucléico), sendo, portanto, agente genotóxico (BIRD, DRAPER, BASRUR, 1982). Em geral, o acetaldeído é rapidamente convertido em acetato, o que não lhe permite provocar alterações. Entretanto, em algumas situações, por exemplo, ingestão excessiva de etanol, a rota de degradação fica estagnada devido à capacidade limitada da enzima aldeído-desidrogenase, determinando acúmulo de acetaldeído. Neste caso é possível que o acetaldeído provoque danos sobre as células (DONG, PENG, YIN, 1996).

A relação entre consumo de etanol e alterações hepáticas também é bem conhecida, estando ele relacionado principalmente à hepatite, esteatose e cirrose (LIEBER, 1988; JOHNSON, 1995). Essas alterações poderiam trazer conseqüências a diversos órgãos, posto que o fígado é um órgão metabolicamente importante na filtragem do sangue. Estando o fígado incapacitado de cumprir suas funções adequadamente, como a de depurar toxinas, estas se manteriam no sangue e poderiam afetar diversas porções do organismo, inclusive a boca (PROTZEL, GIARDINA, ALBANO, 1964).

O sistema imunológico também é, comprovadamente, afetado pelo uso do etanol (SZABO, 1999). Segundo Lundy et al (1975) e Wang, Spitzer (1997), o contato com o etanol diminui o número e a função das células do sistema imunológico. Somando-se a isso, há o fato de o alto valor calórico do etanol fazer com que o alcoolista crônico se alimente mal, potencializando ainda mais esse estado de imunossupressão. A partir daí, também há redução na ingestão de vitaminas, como A e E, que sabidamente têm ação antioxidante (THOMSON, 1978). Esta condição tem maior importância, já que o etanol também está relacionado a um aumento da formação de radicais livres (NAVASUMRIT et al, 2000). Os radicais livres, por sua vez, apresentam capacidade de formar complexos com proteínas, gerando danos a partir da sua modificação (ESPINA et al, 1988). Além disso, Rennie, MacDonald, Dagg, (1982) e

Scott et al (1985) mostraram que a má nutrição é capaz de provocar uma atrofia das mucosas, tornando-as mais suscetíveis à ação de agentes externos.

A morfologia e a função das glândulas salivares encontram-se alteradas como resultado da ingestão habitual do etanol. Sabe-se que, na saliva, existem substâncias, como imunoglobulinas e fatores de crescimento, que têm importante papel na proteção e manutenção das mucosas da cavidade bucal (MAIER, 1986). Assim sendo, uma alteração nas glândulas salivares também poderia, indiretamente, modificar as características fisiológicas das mucosas da boca pela deficiência desses fatores salivares, tornando-as mais vulneráveis a agressões.

Diversos estudos analisaram a influência da ingestão do etanol e do acetaldeído na morfologia e na renovação celular de diferentes segmentos do trato digestivo.

Mascres, Ming-Wen, Joly (1984) demonstraram que, após 290 dias ingerindo etanol, como parte das calorias da sua dieta, ratos *Sprague dawley* apresentaram alterações morfológicas na mucosa da parte superior do esôfago. Observaram atrofia não provocada pela diminuição no número de camadas de células, mas por uma diminuição no volume das células basais.

Mak, Leo, Lieber (1987) analisaram a influência da ingestão do etanol e da deficiência de vitamina A na proliferação e na estrutura da mucosa do esôfago de ratos. O etanol foi introduzido como 36% das calorias da dieta durante 8 semanas e, em seguida, os animais receberam, intraperitonealmente, timidina radioativa marcada com trítio (H-timidina), a fim de marcar as células em síntese de DNA. Perceberam um aumento da proliferação celular na camada basal da mucosa esofágica, nos animais que receberam etanol, na presença ou ausência da vitamina A. O etanol, isoladamente, não mostrou relação com alterações morfológicas. Por outro lado, a deficiência de vitamina A, independentemente da ação do etanol, produziu diminuição do número de células na camada basal e aumento dos grânulos de

ceratohialina, denotando alteração no padrão de maturação celular. Os autores consideraram o aumento da proliferação uma resposta frente ao aumento da descamação. A partir desses resultados, concluíram que o etanol ou seus metabólitos exercem efeito direto na proliferação celular do esôfago.

Também estudando mucosas do esôfago de ratos, Haentjens, De Baker, Willems (1987) avaliaram o efeito do etanol a 56% e de aguardente de maçã (Calvados), na mesma concentração alcoólica, na proliferação celular. Observaram que, tanto uma aplicação isolada de 2 ml, quanto 2 aplicações semanais de 1 ml por 3 semanas, provocaram aumento significativo nos índices de mitoses e metáfases, quando comparados à solução salina, não havendo alteração na espessura epitelial. As observações indicam que tanto o etanol, quanto a aguardente estimularam o aumento da proliferação celular no esôfago, permanecendo a dúvida se esta é efeito direto ou indireto do etanol. Considerando que nenhum sinal histológico de aumento da descamação foi observado, não interpretaram o aumento da proliferação como uma resposta à maior perda de células na superfície. A partir dos seus resultados, os autores concluíram que o etanol, presente nas duas soluções, teve ação mitogênica.

Utilizando mucosa gástrica, Tarnawski et al (1990) constataram que ratos *Sprague dawley*, submetidos a 2 aplicações intragástricas semanais de etanol a 50%, por 14 dias, apresentaram uma maior expressão de bromo-desoxiuridina (BrdU), de fator de crescimento epidérmico (EGF), de fator de crescimento transformante α (TGF α) e de receptor de fator de crescimento (EGFR) nas suas células epiteliais, mostrando que o consumo de etanol tem relação positiva com o aumento da proliferação nestas condições.

Baraona, Pirola, Lieber (1975) submeteram ratos à administração intragástrica e ao consumo de etanol em diferentes concentrações (1-49%) e avaliaram o seu efeito sobre a

morfologia do trato gastrointestinal. As mucosas do jejuno e do íleo mostraram um aumento no número de células e no índice mitótico, indicando maior proliferação celular.

Zucoloto, Rossi (1979) utilizaram a técnica de coloração do Ácido Periódico de Schiff-Hematoxilina (PAS) e imunohistoquímica com marcação de BrdU a fim de avaliar, respectivamente, morfologia e índice mitótico do epitélio do intestino delgado de ratos *Wistar*, após ingestão de etanol a 25 %, por 16 semanas. Encontraram uma redução no comprimento dos vilos e na marcação com BrdU nas mucosas do jejuno e do íleo, demonstrando redução na proliferação celular, evidenciando que o tipo de alteração depende da porção do trato digestivo estudada, bem como de forma de administração e concentração de etanol utilizada.

Simanowski et al (1986) estudaram o efeito da ingestão de etanol a 6,6%, como 36% das calorias da dieta, sobre a renovação do epitélio do trato gastrointestinal de ratos. Após 4 meses de experimento, os animais foram mortos e, exclusivamente na mucosa do reto, houve aumento no número de mitoses e metáfases. Enquanto no grupo controle o compartimento proliferativo se restringiu ao terço basal da cripta, no grupo teste se estendeu até metade da mesma. Os autores justificam essa alteração pelo fato de a mucosa do reto aumentar de forma adaptativa a quantidade de ADH frente à agressão pelo etanol, o que permitiria acúmulo de acetaldeído ou mesmo pela possibilidade de o acetaldeído ser produzido por microrganismos neste sítio. Além disso, consideram a maior proliferação um fenômeno secundário ao efeito tóxico do etanol.

Simanowski et al (1994), estudando proliferação celular na mucosa retal de indivíduos alcoolistas, mostraram aumento da expressão do PCNA nas criptas dos retos desses indivíduos, confirmando o já observado em ratos.

A partir dos autores revisados, observa-se que a maioria dos trabalhos concorda em afirmar que o etanol atua sobre as mucosas do trato digestivo, aumentando a sua proliferação celular.

Apesar de o metabolismo do etanol situar-se predominantemente no fígado, existe uma parte degradada previamente a sua chegada neste órgão. As álcool-desidrogenases (ADHs) foram identificadas em algumas porções do trato digestivo, como nas mucosas do estômago (PESTALOZZI et al, 1983) e da boca (YIN et al, 1993; DONG, PENG, YIN, 1996), em pequenas quantidades. A função das ADHs é variável ao longo do trato gastrointestinal, sendo o etanol metabolizado em diferentes proporções. Mesmo sendo pequenas, essas quantidades são suficientes para que o etanol atue de maneira significativa nessas porções. Na boca, a quantidade de ALDH é ainda menor que a de ADH, sendo facilmente saturada, permitindo acúmulo de acetaldeído mesmo a partir da ingestão de pequenas quantidades de etanol (DONG, PENG, YIN, 1996). Esta capacidade de degradar o etanol é variável entre as pessoas e apresenta relação com o sexo, já que os homens possuem maior concentração dessas enzimas (BARAONA et al, 2001). Segundo Timmons, Nwankwo, Domann (2002), o acetaldeído é capaz de aumentar a expressão do complexo de transcrição proteína ativadora 1 (AP1) e da proteína c-jun em células epiteliais imortalizadas da mucosa bucal, estando isto relacionado à proliferação celular.

Em relação ao metabolismo do etanol, estudos mostram que existem diferentes subtipos de ADH e ALDH, o que poderia explicar essa variação individual na sua capacidade de degradação. Na família das ADHs, existem as de rápida e as de baixa velocidade de ação, sendo que as primeiras provocariam um aporte alto de acetaldeído num curto período de tempo, determinando o seu acúmulo. O mesmo mecanismo vem sendo estudado em relação à aldeído-desidrogenase, para a qual o polimorfismo genético já tem influência comprovada

Contudo, em relação ao polimorfismo da ADH, os achados são controversos e carecem de comprovação (IWAHASHI, SUWAKI, 1998; HARTY et al, 1997; SCHWARTZ, 2001).

Além da produção endógena de acetaldeído, há uma exógena, a partir das bactérias da cavidade bucal e do trato digestivo. Homann et al (1997, 2001) demonstraram que indivíduos que bebem etanol e têm higiene bucal inadequada apresentavam maiores níveis de acetaldeído na saliva, sendo estes reduzidos após utilização de clorexidine. Isso comprova a relação entre microbiota bucal e produção de acetaldeído.

Os estudos mostram que ocorre produção de acetaldéido na cavidade bucal e este, em função da sua toxicidade, poderia ser um dos responsáveis pelas alterações provocadas pelo consumo de etanol, gerando dano às células das mucosas da boca.

Uma das importantes funções do tecido epitelial é proteger o organismo da ação de agentes externos, bem como impedir a perda de líquidos para o ambiente. Uma das principais estruturas responsáveis pelo controle das trocas de líquidos, através das mucosas, é a barreira de permeabilidade. Esta se situa no terço superior dos epitélios ceratinizados, sendo constituída, principalmente, de glicolipídios, produzidos e secretados pelas células epiteliais no espaço intercelular (SQUIER, WERTZ, 1996; SQUIER, FINKELSTEIN, 2001).

Vários experimentos relacionaram exposição ao etanol com alterações na permeabilidade das mucosas. Os trabalhos de Squier, Cox, Hall (1986); Smith, Cruchley, Williams (1991); Trigkas et al (1993), Du et al (2000), Howie et al(2001), através de estudos *in vitro*, demonstraram que o contato direto com o etanol é capaz de alterar a permeabilidade das mucosas da cavidade bucal a carcinógenos. Concentrações entre 15% e 30% aumentariam, enquanto concentrações em torno de 40-50%, por um efeito denominado fixador, provocariam a sua redução. O aumento da permeabilidade, relacionado às baixas concentrações, se daria pela modificação em nível de lipídios, tanto intercelulares quanto de membrana, responsáveis pela impermeabilização do tecido epitelial. Trigkas et al (1993) e

Howie et al (2001) revelaram ainda que o conteúdo lipídico não foi diferente entre os grupos, sugerindo que o aumento da permeabilidade ocorre em função do rearranjo na barreira, o que afeta a distribuição dos lipídios e não os remove. Uma vez Trigkas (1993) e Howie et al (2001) tiveram um período de acompanhamento curto, não se pode descartar o envolvimento de outros mecanismos na alteração da barreira de permeabilidade. Logo, o etanol serviria como agente facilitador para a penetração de carcinógenos, tornando os tecidos mais suscetíveis a sua ação.

O epitélio bucal mantém sua homeostase pelo processo de renovação celular contínuo, no qual as células são produzidas por divisões mitóticas nas camadas mais profundas e migram para a superfície, substituindo as que sofrem descamação. Assim, pode-se considerar que as células epiteliais se constituem de duas populações funcionalmente diferentes. Uma população progenitora se divide para formar novas células e outra população em maturação sofre continuamente um processo de diferenciação, para formar uma camada protetora na superfície (HILL, 1994; SQUIER, FINKELSTEIN, 2001).

Diante da ação de agentes externos, a mucosa bucal tem capacidade de adaptação, pela alteração dos processos de proliferação, morte ou maturação celular que modificam o processo de renovação epitelial e, conseqüentemente, sua morfologia. Até mesmo fatores intrínsecos, como o envelhecimento, provocam alterações, havendo redução da sua espessura, com achatamento da interface epitélio-conjuntivo (SCOTT et al, 1983; WILLIAMS, CRUCHLEY, 1994). Porém, em relação à influência do envelhecimento na proliferação celular, não há concordância na literatura (LAVELLE, 1968; BARAKAT, TOTO, CHOUKAS, 1969; TOTO, RUBINSTEIN, GARGIULO, 1975; CLEATON-JONES, 1976; SCOTT et al, 1983; HILL, 1994; WILLIAMS, CRUCHLEY, 1994), apesar de a maioria dos autores afirmarem que são eventos independentes (LAVELLE, 1968; BARAKAT, TOTO, CHOUKAS, 1969; CELENLIGIL-NAZLIEL et al, 2000).

Mascrès, Joly (1981) estudaram as modificações histoquímicas, morfológicas e ultra-estruturais na mucosa jugal de ratos *Sprague dawley*, após 290 dias de administração de etanol a 5%, correspondendo a 36 % das calorias da sua dieta líquida. Após 98 dias, perceberam aumento na espessura epitelial, na camada de ceratina e no número de mitoses. Além disso, houve maior presença de áreas positivas para a fosfatase ácida, enzima presente nos lisossomos, sugerindo aumento da autólise. Notaram ainda aumento na quantidade de gotículas lipídicas, relacionadas ao consumo de etanol.

Valentine et al (1985) avaliaram, morfológicamente, necrópsias da borda e da porção anterior do dorso das línguas clinicamente normais de 161 pacientes. Utilizaram entrevista com familiares, para se informarem sobre os hábitos do consumo de fumo e de bebidas alcoólicas, nos últimos 5 anos. Classificaram o consumo de álcool em níveis, a partir do número de unidades de álcool consumidas por dia (unidade = meia medida de cerveja, um cálice de vinho ou uma dose de destilados). Os pacientes que habitualmente consumiam mais do que 6 unidades de etanol por dia apresentaram redução na espessura média das mucosas da borda e do dorso da língua. Na camada progenitora (basal), houve aumento na espessura pelo maior tamanho médio das células, enquanto que, na camada de maturação (suprabasal), houve diminuição da espessura pela redução do tamanho médio das células. O estudo mostrou claramente que o álcool está associado com alterações no epitélio lingual de humanos na ausência de evidência clínica de doença. Os autores comparam essa atrofia pelo etanol com aquela observada a partir do envelhecimento.

Maier et al (1994) investigaram o efeito do consumo de etanol a 6,6%, por 6 meses, na mucosa da língua e do assoalho de ratos. Através da análise da morfologia e da proliferação celular por citometria de fluxo, mostraram redução na espessura epitelial significativa apenas na mucosa do assoalho. Os núcleos da camada basal das mucosas apareceram hipercromáticos, irregulares e aumentados de volume. Além disso, a camada basal

freqüentemente mostrava mais do que uma linha de células, resultado da atividade mitótica aumentada, confirmada pelo maior número de células na fase S do ciclo celular. Segundo estes autores, a maior proliferação que observaram seria induzida pelo efeito citotóxico do etanol, e a atrofia por ele provocada tornaria as mucosas mais suscetíveis à ação de carcinógenos.

Homann et al (1997) investigaram se a administração de 120mM acetaldeído induzia alterações de diferenciação e proliferação das mucosas da língua, da epiglote e do esôfago de ratos. Encontraram aumento da espessura epitelial, em todos os sítios, relacionada com a administração de acetaldeído. Da mesma forma, houve maior número de camadas marcadas com Ki67 e citoqueratina 14 no grupo teste, enquanto que, nos animais do grupo controle, a marcação se restringiu à camada basal. Isso demonstra modificação na atividade proliferativa e na maturação, respectivamente. Os autores sugerem que o dano direto pelo acetaldeído sobre as mucosas provocaria essa hiper-regeneração.

Através da microscopia eletrônica de transmissão, Martinez, Martinez, Watanabe (1998) testaram o efeito da ingestão de 40° GL, por 9 meses, na mucosa palatina de ratos (*Ratus norvegicus albinos*). Perceberam gotículas lipídicas, núcleos picnóticos, células em autólise e aumento dos espaços intercelulares nas células da camada basal. Porém, nas outras camadas de células, nenhuma alteração foi constatada. Estes autores concluem que a ingestão de etanol é responsável por importantes alterações celulares.

Martinez et al (2002) analisaram o efeito da ingestão de etanol a 20% nas células da mucosa palatina de *Calomys callosus*, um roedor. Após 7 meses, várias alterações, como acúmulo de gotículas lipídicas no citoplasma, aumento da eletrodensidade nuclear e dispersão da cromatina, foram constatadas. Algumas células apresentaram aumento das mitocôndrias e núcleos picnóticos, sugerindo autólise. Prováveis vacúolos digestivos foram vistos junto aos grânulos de lipídios, e os espaços intercelulares não foram diferentes entre o grupo controle e

o que ingeriu etanol. As alterações estiveram presentes em todas as camadas epiteliais. Gotículas lipídicas foram observadas também no cório, entre as fibras do tecido conjuntivo.

Através da técnica da citologia esfoliativa, Ogden, Wight, Rice (1999) estudaram os efeitos do consumo de etanol sobre a mucosa bucal. Seus resultados mostraram que os raspados citológicos de indivíduos consumidores habituais de etanol, exibiam células com menores áreas citoplasmática e nuclear do que os dos indivíduos do grupo controle. Os autores relacionaram essa diminuição a um provável efeito desidratante do etanol sobre a mucosa da boca.

Também utilizando citologia esfoliativa, Larentis et al (2000) analisaram os esfregaços citológicos da mucosa bucal de camundongos, submetidos a 2 aplicações tópicas semanais e à ingestão de etanol a 40°GL. Obtiveram, após 6 meses de experimento, uma prevalência maior de células anucleadas nos esfregaços dos animais dos grupos teste, fato relacionado à maior descamação, provocada pelo contato com o álcool. Nestes grupos, observaram também tendência maior ao aparecimento de células superficiais nucleadas, concluindo que o etanol estaria ligado a um maior índice de descamação.

Sanfelice (2001) avaliou as alterações morfológicas no epitélio do dorso da língua dos mesmos animais citados acima, constatando que o etanol a 40°GL provocou alterações, tanto pela aplicação tópica, quanto pela ingestão. O material foi obtido através de biópsias, realizadas no início do experimento, aos 6 e aos 12 meses, e submetido à técnica de coloração da Hematoxilina/ Eosina (HE). Na avaliação da relação entre os comprimentos da camada basal e superficial, como indicador de proliferação celular, constatou aumento no grupo aplicação tópica aos 12 meses. Em relação à espessura da camada de ceratina, houve redução nos grupos expostos ao álcool, aos 6 e 12 meses, indicando que o contato com o etanol atua elevando o índice de descamação do epitélio. Analisou ainda a espessura do epitélio,

considerada indicador de atividade proliferativa, percebendo sua redução nos grupos teste em relação ao grupo controle.

Ainda com o mesmo material e metodologia, Maito (2001) avaliou a expressão do PCNA nas camadas basal e suprabasal do mesmo epitélio lingual. Os seus resultados mostraram que, aos 12 meses de experimento, o número total de células PCNA positivas da camada intermediária foi maior no grupo de animais que ingeriram etanol continuamente. Isso indica que o etanol aumenta a proliferação celular pela sua ingestão e após um período mínimo de consumo de 6 meses, uma vez que só foram observadas alterações aos 12 meses de experimento.

Entretanto, sabe-se que o PCNA se expressa por um longo período do ciclo celular, abrangendo as fases G1, G2 e S, sendo mais reativa na última, quando ocorre a duplicação do DNA. Isso a torna detectável em grande parte do ciclo celular, não sendo tão específica para a marcação de proliferação celular. Essa proteína tem meia-vida longa, o que lhe confere uma eliminação lenta, permitindo que esteja presente numa célula que, na verdade, não está mais proliferando (SCOTT et al, 1991; ALLISON, BEST, 1998). Além de marcar células que estão se dividindo ou sintetizando DNA, o PCNA está presente em células que estão reparando o seu material genético, como demonstraram Toschi, Bravo (1988). Assim sendo, a relação entre a sua expressão e atividade proliferativa é passível de crítica.

2.2 REGIÕES ORGANIZADORAS NUCLEOLARES E A TÉCNICA DE AgNOR

Regiões Organizadoras Nucleolares (NORs) são segmentos de DNA, que, em humanos, se situam no braço curto dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22 e codificam o RNA ribossômico (GOODPASTURE, BLOOM, 1975; GIRI, NOTTINGHAM, LAWRY, 1989), contribuindo, portanto, para a síntese ribossomal. Durante a interfase, essas

regiões se aproximam e, juntamente com RNAr (RNA ribossômico) e proteínas, determinam a formação do nucléolo (CROCKER, 1990). Quando essas regiões estão sendo ativamente transcritas, elas se associam a proteínas que têm afinidade pela prata, conhecidas como AgNORs, que aparecem como pontos pretos dentro do núcleo amarelo-acastanhado (GOODPASTURE, BLOOM, 1975; MILLER et al, 1976; BUYS, OSINGA, 1980; HUBBELL et al, 1980; .HERNANDEZ-VERDUN, 1983; TRERÉ, 2000). Essas proteínas foram identificadas como nucleolina, ou C23, e nucleofosmina, ou B23 (BUYS, OSINGA, 1980; SPECTOR, OCHS, BUSCH,1984; ROUSSEL, HERNANDEZ-VERDUN, 1994), e têm função regulatória sobre a transcrição de RNAr (DERENZINI, 2000).

Em função da estreita ligação entre nucléolo e proliferação celular, inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos a fim de relacionar expressão das AgNORs com prognóstico (CROCKER, EGAN, 1988; CROCKER, BOLDI, EGAN, 1989, SANO et al, 1991; TEIXEIRA et al, 1996; PICH, CHIUSA, MARGARIA, 2000, DERENZINI et al, 2000) e grau de malignidade das lesões neoplásicas (ANTONY, LEONG, GILHAM, 1989; SANO et al,1991; PICH, CHIUSA, MARGARIA, 2000). Da mesma forma, a técnica vem sendo utilizada para distinguir lesões neoplásicas benignas de malignas (EGAN, CROCKER, 1988; ANTONI, LEONG, GILHAM, 1989; CABRINI et al, 1992; CHATTOPADHYAY, CHAWDA, DOSHI, 1994; MIGALDI et al, 1998) e para diferenciar lesões com aspecto histopatológico semelhante, como sarcoma de Ewing, neuroblastoma e rabdomiossarcoma (EGAN et al, 1987). A proliferação celular é uma das características das lesões neoplásicas que, isoladamente, não define o seu comportamento, logo, muitos desses autores não obtiveram sucesso ao investigar essas relações (EGAN, CROCKER, 1988; HOWAT et al, 1988; GIRI, NOTTINGHAM, LAWRY, 1989; FONSECA SOARES, 1993; TOIKKANEN, JOENSUU, 1993; COLEMAN, ALTINI, GROENEVELD, 1996). Além disso, não obrigatoriamente uma neoplasia maligna tem maior atividade proliferativa do que a sua

contraparte benigna (EGAN, 1987; DERENZINI, 2000). Portanto, a grande maioria dos autores concorda que a técnica de AgNOR é útil exclusivamente como marcador de proliferação (GIRI, NOTTINGHAM, LAWRY, 1989; RAYMOND, LEONG, 1989; SCHWINT et al (1993); CARBONELI et al, 1994; TEIXEIRA et al, 1996; SIRRI et al, 1997; DERENZINI et al, 1998; COSTA et al, 1999; DERENZINI et al, 2000, DERENZINI, 2000; SIRRI, ROUSSEL, HERNANDEZ-VERDUN, 2000; CHU, LIN, LIU , 2001).

As AgNORs podem ser quantificadas a partir da contagem ou da mensuração das áreas dos pontos. A contagem do número de AgNORs foi a primeira forma de quantificação estabelecida e, embora seja a mais utilizada, é considerada imprecisa e pouco reproduzível por alguns autores (HOWAT et al, 1988; GIRI, NOTTINGHAM, LAWRY, 1989; CABRINI et al, 1992; FONSECA, SOARES, 1993; CECCARELLI et al 2000). Crocker (1990) e Derenzini, Ploton, (1991) afirmam que o aumento do número de AgNORs é o reflexo da maior atividade proliferativa das células. Segundo esses autores, quanto mais acelerado está o ciclo celular, menor o tempo e a possibilidade de as NORs, individualizadas em cada cromossomo durante a mitose, conseguirem agrupar-se durante a interfase. Uma vez que as AgNORs são proteínas intimamente relacionadas às NORs, também reproduziriam esta desagregação. Outra explicação para a relação entre expressão de AgNORs e proliferação seria pela necessidade de uma célula produzir mais rapidamente ribossomos para as células-filhas, quando o ciclo celular está acelerado, a fim de que a sua quantidade esteja duplicada antes da divisão (DERENZINI et al, 1998; DERENZINI, 2000; DERENZINI et al, 2000).

Posteriormente, foi introduzida a mensuração das áreas das AgNORs como método alternativo de quantificação, por ser mais reproduzível e confiável em termos de acurácia (RÜSCHOFF et al, 1990; TEIXEIRA et al, 1996; DERENZINI et al, 1998; MIGALDI et al, 1998; CECCARELLI et al, 2000; DERENZINI et al, 2000; CANET et al, 2001), sendo, inclusive, adotado como método padrão de avaliação (ÖFNER et al, 1995). Entre as suas

vantagens, está o fato de considerar a variação no volume existente entre os pontos e de não sofrer a influência de pontos associados, os quais dificultam a padronização do método de contagem (TOIKKANEN, JOENSUU, 1993).

Carboneli et al (1994), ao induzirem o desenvolvimento de carcinomas em camundongos, a partir da utilização de um agente carcinogênico e um mitógeno, constataram que a avaliação das áreas das AgNORs permitiu que fossem detectadas alterações celulares incipientes, o que não foi possível pelo método da contagem. Em seus experimentos, mesmo na ausência de lesões morfológicamente detectáveis à microscopia óptica, os tecidos que mostraram modificações nas áreas de AgNORs, posteriormente, desenvolveram lesões observadas histopatológica e clinicamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Schwint et al (1993), utilizando esta técnica após submeter a pele de ratos à ação da radiação. Estes autores consideraram a mensuração das áreas um instrumento mais sensível do que a contagem das AgNORs, pois esta só mostrou alteração tardiamente.

A quantidade das AgNORs tem mostrado correlação positiva com outros marcadores de proliferação conhecidos, como o PCNA (RAYMOND, LEONG, 1989; HEINISCH, BARTH, 1995; MIGALDI et al, 1998; COSTA et al, 1999; YUE, IWAI, FURUTA, 1999; CHU, LIN, LIU, 2001), o Ki 67 (MIGALDI et al, 1998; COSTA et al, 1999; CECCARELLI et al, 2000) e o BrdU (LEEK, ALISON, SARRAF, 1991). Da mesma forma, tem-se observado menor quantidade dessas proteínas em células quiescentes ou com baixa atividade proliferativa (CROCKER, NAR, 1987; SIRRI et al, 1997; SIRRI, ROUSSEL, HERNANDEZ-VERDUN, 2000) e um aumento nas fases S e G2 do ciclo celular (DERENZINI, 1990; GUILLAUD, WOZNIK, SEIGNEURIN, 1993; SIRRI et al, 1997; SIRRI, ROUSSEL, HERNANDEZ-VERDUN, 2000). Isso reforça, ainda mais, a sua relação com proliferação celular, pois tecidos com grandes quantidades de AgNORs apresentariam maior proporção de células nestas fases do ciclo. Da mesma forma, Trerè, Pession, Derenzini

(1989), Derenzini et al (1995, 1998, 2000), trabalhando com cultura de células neoplásicas de diferentes linhagens, observaram que, quanto menor o tempo de duplicação da célula, maior a área das AgNORs, estabelecendo sua relação com a aceleração do ciclo celular.

Uma vantagem da técnica de AgNOR sobre os outros marcadores de proliferação seria, portanto, a de informar a respeito da velocidade do ciclo celular e não apenas da fração de crescimento, através da identificação das células que estão ou não proliferando (QUINN, WIGHT, 1990; DERENZINI, 2000; DERENZINI et al, 2000).

3. PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral:

Este trabalho se propõe a avaliar o efeito do etanol na proliferação celular do epitélio lingual, a partir da quantificação das AgNORs.

Objetivos Específicos:

1- Analisar o efeito da aplicação tópica de etanol na atividade proliferativa das células das camadas basal e suprabasal do epitélio a partir da quantificação das AgNORs.

2- Analisar o efeito da ingestão de etanol na atividade proliferativa das células das camadas basal e suprabasal do epitélio a partir da quantificação das AgNORs.

4. METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados os blocos produzidos pela parte experimental de dissertações defendidas em julho de 2001 no Programa de Pós-Graduação em Odontologia-Área de Concentração em Patologia Bucal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. A metodologia utilizada segue transcrita.

O estudo foi um ensaio experimental randomizado, cego, em paralelo, controlado por placebo. Foram utilizados 60 camundongos (*Mus domesticus domesticus*) da linhagem CF1, fêmeas, híginas, virgens e heterogênicas, com 2 meses de idade e peso médio inicial de 32 gramas, adquiridos na Divisão de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em saúde – FEPPS.

Os camundongos foram separados em 12 gaiolas, de forma aleatória, por pessoas que desconheciam o propósito do estudo. Posteriormente, foram divididos em três grupos, com 20 animais cada, através de sorteio. O primeiro foi identificado como GRUPO CONTROLE (GC), seguindo com alimentação e bebida à vontade. O segundo foi identificado como GRUPO INGESTÃO (GI), tendo a água substituída por álcool etílico (Álcool etílico, P.A. – etanol absoluto marca Reagen – fabricante Quimibrás Indústrias Químicas S.A. – Rio de Janeiro – RJ) na graduação de 40° GL (40ml de etanol/ 100ml água), que lhe foi fornecido através do recipiente chamado de “mamadeira”, onde normalmente é fornecida a água. O terceiro foi identificado como GRUPO APLICAÇÃO TÓPICA (GAT) que, além do tratamento dado ao grupo controle, recebeu aplicações tópicas de álcool, na mesma graduação alcoólica do GI. Estas aplicações tópicas foram realizadas com o uso de uma seringa para aplicação de insulina (volume de 1ml) sem agulha. Sua ponta era introduzida na cavidade bucal dos camundongos que era irrigada com o volume total da seringa, por uma vez apenas,

dois dias por semana. Tal procedimento se dava com o camundongo imobilizado pela cauda e pelo cangote, mantendo-se a cabeça voltada para baixo e a boca aberta, com a intenção de evitar ou minimizar a deglutição da solução, simulando o ato de bochechar. Não se fez uso de analgesia para este procedimento. A concentração de etanol utilizada foi 40° GL por ser a presente na aguardente ou cachaça, a bebida mais consumida pela população brasileira (NEVES, BORGES, VILELA, 1989).

Os três grupos seguiram alimentando-se com a ração NUVILAB CR1 (fabricante NUVITAL Nutrientes Ltda. – Colombo – Paraná – PR) ao longo de todo o experimento.

Foram registrados, semanalmente, os volumes (em mililitros) de água, de álcool etílico e os pesos de ração consumidos. Durante o período experimental, os camundongos permaneceram nas instalações do Biotério da Divisão de Produção e Experimentação Animal FEPPS.

Os animais foram submetidos à coleta de material para exame, através da remoção de uma amostra da mucosa do dorso lingual com o auxílio de um “punch” de biópsia de 3 mm de diâmetro (*Biopsy Punch* – fabricante *Stiefel Laboratorium GmbH* – importado e distribuído por Laboratórios Stiefel Ltda.- Guarulhos – SP) e um cabo de bisturi (modelo Bard-Parker), montado com uma lâmina nº 12, sendo a amostra (peça cirúrgica) colocada com seu lado cruento sobre papel absorvente, para evitar distorções durante a fixação. Este procedimento foi realizado por 2 operadores, sendo os animais sedados por inalação de éter (Éter Sulfúrico Techn – Importadora Química Delaware Ltda.). Cada amostra recebeu identificação individual conforme registro no livro do laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Esta coleta foi feita no 1° (inicial), 6° e 12° mês do experimento, totalizando 3 coletas com um intervalo de 6 meses entre elas.

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

Ao final de 21 meses de experimento, os animais foram mortos por deslocamento cervical com analgesia prévia. Posteriormente, foram dissecados, tendo a sua língua, seus órgãos internos (esôfago, estômago, intestino, pulmão, coração, pâncreas, fígado, glândulas salivares e rins) e seus esqueletos removidos, fixados, processados e emblocados para utilização em futuros trabalhos. As disseções foram realizadas por 4 operadores treinados por veterinários da FEPPS .

As peças foram fixadas por 24 horas em formalina neutra tamponada a 10% e processadas para inclusão 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, 2001; SANFELICE, 2001).

Este experimento está de acordo com a Declaração Universal dos Direitos Animais e com os princípios éticos na experimentação animal, emitida pelo Código Brasileiro de Experimentação Animal (GOLDIM, 1997), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia, conforme Processo nº PPGO 40/99 (ANEXO A).

De todos os 164 blocos produzidos pela parte experimental das dissertações de MAITO (2001) e SANFELICE (2001) foram analisados 137, conforme Quadro 1.

Quadro 1. Distribuição dos blocos analisados dos grupos controle (GC), aplicação tópica (GAT) e ingestão (GI) nos diferentes tempos experimentais, Porto Alegre, 2003.

TEMPO GRUPO	Inicial		6 meses		12 meses	
	disponíveis	avaliados	disponíveis	avaliados	disponíveis	avaliados
CONTROLE	20	15	19	13	17	14
APLIC. TÓPICA	20	17	18	13	16	12
INGESTÃO	20	16	20	14	14	13

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia - UFRGS

Estes blocos foram submetidos a cortes de 4 μ m (micrótomo LEICA – modelo RM2155) e neles realizou-se a técnica de impregnação pela prata (ANEXO B) para evidenciação das AgNORs, segundo protocolo estabelecido por PLOTON et al (1986). Além dessas lâminas, estiveram disponíveis as coradas pela técnica da HE nas dissertações já mencionadas. Todo o material foi produzido no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Foram capturadas imagens de campos microscópicos de cada lâmina, através de uma câmera de vídeo (JVC, com 1 CCD, modelo TK-C620U, colorida) acoplada a um microscópio binocular, marca Zeiss, (Modelo Standart 20), no aumento de 1000x, com a utilização de óleo de imersão Olympus (Olympus Optical CO.. LTD., Japan). Para os registros das imagens foi utilizado o software Microsoft VidCap 32, com a resolução 440 x 330 px.

A partir da extremidade do corte de cada lâmina, foram registradas imagens de 30 campos consecutivos e sucessivos ou até que todos os campos microscópicos contidos nos cortes histológicos fossem esgotados. A fim de que cada célula fosse quantificada apenas uma vez, procurou-se capturar uma única imagem por campo. Contudo, eventualmente, foram obtidas mais do que uma, em diferentes planos de foco, a fim de adquirir um maior número de células, mas sem que alguma delas fosse incluída mais de uma vez. A captura das imagens se

deu em até 3 dias após a confecção das lâminas, para que a qualidade da impregnação dos cortes fosse preservada.

A avaliação se deu pela contagem do número e pela mensuração das áreas dos pontos das AgNORs por núcleo das células da mucosa. Foram mensuradas 100 células por lâmina, sendo 50 da camada basal e 50 da camada suprabasal. Foram utilizados tantos campos, quantos necessários, até que o número de células desejado por camada em cada unidade amostral fosse atingido.

Considerou-se 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. Utilizou-se 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 à presença dos lisossomos que, por possuírem a enzima fosfatase ácida, permitem impregnação pela prata não relacionada às AgNORs (MASCRÈS, JOLY, 1981)

Antes da calibragem, realizou-se um treinamento com o professor orientador, a fim de padronizar os critérios de contagem. A calibragem foi realizada no período pré-quantificação e repetida antes do término da coleta de dados. Foi sorteada 1 lâmina, que teve leitura inicial de 50 células, repetida após 2 semanas, a partir do mesmo método. Obteve-se o valor mínimo de 0,7 para o coeficiente kappa.

Para as análises foi utilizado o software IMAGELAB (Sistema de Processamento e Análise de Imagens, Softium Sistemas de Informática, São Paulo, Brasil), versão 2.3, instalado no computador já mencionado, respeitando as especificações do fabricante. Antes da quantificação, foi aplicada, em todas as imagens, a ferramenta filtro mediana com o valor 4 que, recomendada pelo manual de instruções do programa, para proporcionar uma redução do ruído eletrônico inerente ao processo de captura.

A quantificação foi feita por um examinador que não tomou conhecimento do grupo ao qual pertenciam as lâminas, para fins de cegamento.

Os resultados foram dispostos na forma de tabelas, sendo apresentadas as médias e os desvios-padrão dos grupos ao longo do tempo. Os cálculos das médias e dos desvios-padrão foram feitos com o programa Microsoft Excel 5.0 e, após a digitação, todos os dados foram conferidos. Procedeu-se a análise estatística pelo uso do software SPSS, sendo utilizados o teste Análise da Variância (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas (post-hoc) da mínima diferença significativa (Least Significant Difference - LSD) tanto para a comparação entre os grupos, como para a comparação dentro de cada grupo, ao longo do tempo.

5. RESULTADOS

5.1 ANÁLISE PELA CONTAGEM DO NÚMERO DE AgNORs POR NÚCLEO

Tabela 1. Distribuição das médias e desvios-padrão das contagens do número de AgNORs por núcleo das células da camada basal, nos grupos controle (GC), aplicação tópica (GAT) e ingestão (GI) ao longo do tempo, Porto Alegre, 2003.

TEMPO	Inicial	6 meses	12 meses
GRUPO	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
CONTROLE	2,09 (0,19) Aa	2,17 (0,26) Aa	2,01 (0,27) Aa
APLIC. TÓPICA	2,09 (0,19) Aa	2,11 (0,32) Aa	2,07 (0,21) Aa
INGESTÃO	2,11 (0,22) Aa	2,03 (0,24) Aa	2,15 (0,20) Aa

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS
Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si. As letras minúsculas relacionam grupos em cada tempo e as maiúsculas os tempos experimentais de um mesmo grupo (Teste da Análise da Variância com nível de significância de 0,05)

As médias mostraram pequenas variações, que não foram estatisticamente significantes (Teste da Análise da Variância), tanto entre os grupos como dentro de cada grupo ao longo do tempo.

Tabela 2. Distribuição das médias e desvios-padrão das contagens do número de AgNORs por núcleo das células da camada suprabasal, nos grupos controle (GC), aplicação tópica (GAT) e ingestão (GI) ao longo do tempo, Porto Alegre, 2003.

TEMPO	Inicial	6 meses	12 meses
GRUPO	Média (DP)	Media (DP)	Média(DP)
CONTROLE	1,93 (0,32) Aab	2,01 (0,36)Aa	2,12 (0,39) Aa
APLIC. TÓPICA	1,84 (0,24)Aa	1,93 (0,33)Aa	1,92(0,25) Aa
INGESTÃO	2,09 (0,29)Ab	1,84 (0,23)Ba	2,07 (0,27)Aa

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia - UFRGS
Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si. As letras minúsculas relacionam grupos em cada tempo e as maiúsculas os tempos experimentais de um mesmo grupo.

Entre a e b, $p=0,039$ (Teste da Análise da Variância com nível de significância de 0,05 e post-hoc da mínima diferença significativa)

Entre A e B, $p=0,027$ (Teste da Análise da Variância com nível de significância de 0,05 e post-hoc da mínima diferença significativa)

Houve diferença estatisticamente significativa ($p= 0,039$), no tempo inicial entre o GAT e o GI em relação à contagem de AgNORs na camada suprabasal sendo maior no GI.

Além disso, observou-se redução significativa no número das AgNORs no grupo ingestão entre o início do experimento e os 6 meses e um aumento significativo entre 6 e 12 meses ($p=0,027$).

5.2 ANÁLISE PELA MENSURAÇÃO DA ÁREA DE AgNORs POR NÚCLEO

Tabela 3. Distribuição das médias e desvios-padrão (DP) da mensuração das áreas de AgNORs por núcleo (μm^2) das células da camada basal, nos grupos controle (GC), aplicação tópica (GAT) e ingestão (GI) ao longo do tempo, Porto Alegre, 2003.

GRUPO	TEMPO	Inicial	6 meses	12 meses
		Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
CONTROLE		2,41 (0,49) Aa	2,33 (0,33) Aa	2,58 (0,59) Aa
APLIC. TÓPICA		2,44 (0,48) Aa	2,38 (0,42) Aa	2,32 (0,32) Aa
INGESTÃO		2,36 (0,40) Aa	2,32 (0,41) Aa	2,59 (0,45) Aa

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS
Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si. As letras minúsculas relacionam grupos em cada tempo e as maiúsculas os tempos experimentais de um mesmo grupo. (Teste da Análise da Variância com nível de significância de 0,05).

As médias mostraram pequenas variações, que não foram estatisticamente significantes (Teste da Análise da Variância), tanto entre os grupos como nos grupos ao longo do tempo.

Tabela 4. Distribuição das médias e desvios-padrão (DP) da mensuração das áreas de AgNORs por núcleo (μm^2) das células da camada suprabasal, nos grupos controle

(GC), aplicação tópica (GAT) e ingestão (GI) ao longo do tempo, Porto Alegre, 2003.

TEMPO	Inicial	6 meses	12 meses
GRUPO	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
CONTROLE	3,34 (0,81) Aa	3,27 (0,69) Aa	3,7 (0,80) Aab
APLIC. TÓPICA	3,31 (0,68) Aa	3,58 (0,56) Aa	3,24 (0,43)Aa
INGESTÃO	3,51 (0,65) ABa	3,14 (0,67)Aa	3,93 (0,72)Bb

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia – UFRGS

Teste da Análise da Variância com nível de significância de 0,05

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si. As letras minúsculas relacionam grupos em cada tempo e as maiúsculas os tempos experimentais de um mesmo grupo.

Entre a e b, $p=0,047$ (Teste da Análise da Variância com nível de significância de 0,05 e post-hoc da mínima diferença significativa)

Entre A e B, $p=0,017$ (Teste da Análise da Variância com nível de significância de 0,05 e post-hoc da mínima diferença significativa)

A análise das áreas das AgNORs na camada suprabasal mostrou uma diferença estatisticamente significativa aos 12 meses entre o GAT e o GI ($p=0,047$), sendo maior no último. Contudo nem o GAT nem o GI tiveram áreas estatisticamente diferentes do grupo controle. Observou-se ainda que o GI teve entre 6 e 12 meses um aumento significativo na mensuração das suas áreas ($p=0,017$).

Os resultados mostram que as únicas diferenças foram a redução do número das AgNORs entre o início e 6 meses e o aumento do número e da área da AgNORs entre 6 e 12 meses na camada suprabasal da mucosa dos animais que ingeriram etanol.

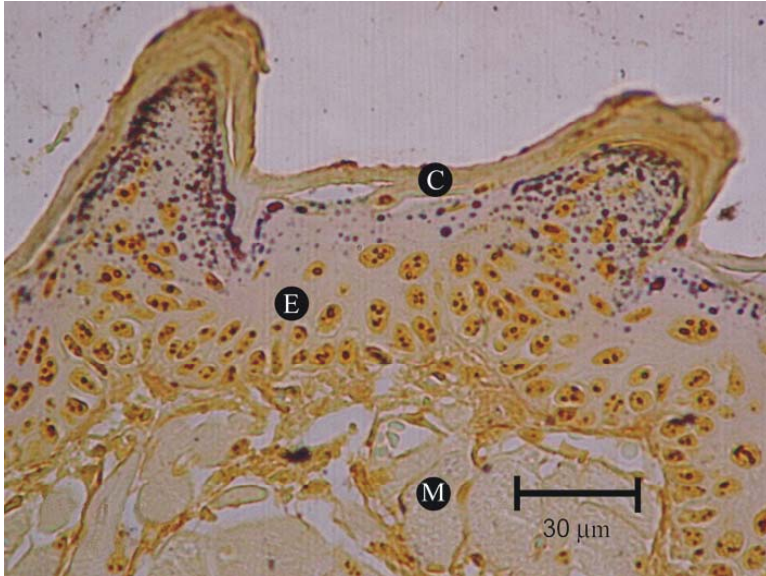


FIGURA 1 - Fotomicrografia da mucosa lingual de animal do grupo ingestão no início do experimento, impregnada pela prata para observação das AgNORs. Observa-se a presença do tecido epitelial (E), tecido muscular (M) e camada de ceratina (C) Técnica de impregnação pela prata - Aumento original de 400x.

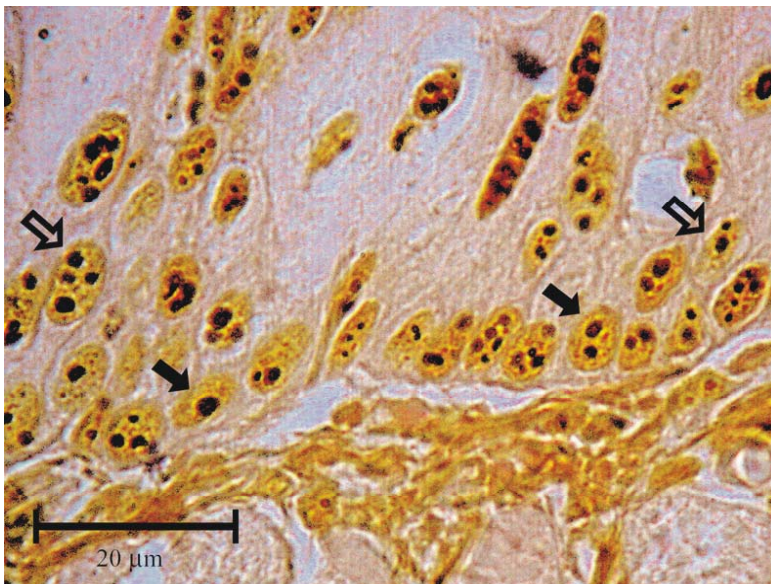


FIGURA 2- Fotomicrografia da mucosa lingual de animal do grupo ingestão no início do experimento, impregnada pela prata para observação das AgNORs. Observa-se células da camada basal (setas cheias) e células da camada suprabasal (setas vazadas). Técnica de impregnação pela prata - Aumento original de 1000x.

6. DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se que a atividade proliferativa não se modificou com o envelhecimento (tabelas 1, 2, 3 e 4), uma vez que, no grupo controle, não houve variação na quantificação das AgNORs, confirmando os achados de Scott (1983); Hill (1994), Maito (2001) e Celenligil-Nazliel et al (2000). Portanto, o aumento da espessura epitelial observado por Sanfelice (2001) no Grupo Controle, não se dá pelo aumento da proliferação celular, sendo apenas o reflexo do aumento da camada de ceratina devido a menor descamação. Esta pode ser uma característica fisiológica específica desta espécie de camundongos, já que a maioria dos estudos com outros animais mostra uma redução da espessura epitelial com o envelhecimento (SCOTT, 1983; WILLIAMS, CRUCHLEY, 1994). A discordância existente na literatura quanto à relação entre proliferação celular e envelhecimento se deve às diferentes técnicas, sítios anatômicos, faixas etárias e modelos experimentais utilizados, permanecendo ainda um tema a ser estudado (TOTO, RUBINSTEIN, GARGIULO, 1975; CLEATON-JONES, 1976; HILL, 1994; WILLIAMS, CRUCHLEY, 1994). Neste trabalho, o grupo controle foi utilizado somente para diferenciar o efeito envelhecimento daquele resultante da exposição ao etanol.

Os resultados encontrados no GAT mostraram que as aplicações tópicas de etanol, na concentração e na frequência utilizadas, não modificaram a proliferação celular na mucosa lingual (tabelas 1, 2, 3 e 4), o que já havia sido constatado por Maito (2001) através da marcação do PCNA. Esses achados contrariam os de Sanfelice (2001) que interpretou como aumento da proliferação a maior razão entre comprimento da camada basal e comprimento da camada superficial. Contudo, o fato de esta razão ser influenciada pela orientação do plano do corte histológico torna a sua utilização como indicativo de atividade proliferativa discutível.

Para este fim, é preferível a utilização da técnica de AgNOR ou de outro marcador de proliferação que já tenha a sua relação com atividade proliferativa bem estabelecida.

Em relação ao GI, a contagem do número das AgNORs revelou uma redução entre o período inicial e os 6 meses (tabela 2). 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, seja de forma reativa, ou para afastar o agente agressor, ocorre um aumento da proliferação, que pôde ser identificado tanto pela contagem, como pela mensuração das áreas das AgNORs (tabelas 2 e 4). Estes resultados demonstram o efeito mitogênico do etanol sobre as mucosas e corroboram as afirmações de Mascrés, Joly (1981), Maier et al (1994), Homann et al (1997) e Maito (2001).

A redução da espessura epitelial, interpretada por Sanfelice (2001) como uma diminuição na renovação, na verdade, reflete o aumento da descamação, o que pode ser comprovado pela redução da camada de ceratina observada pelo autor neste grupo. Valentine, et al (1985) e Maier et al (1994) encontraram redução da espessura epitelial e aumento da proliferação epitelial, mostrando que não se pode assumir espessura epitelial como indicativo de atividade proliferativa.

A redução da espessura epitelial da mucosa bucal a partir do consumo de etanol (VALENTINE, et al, 1985; MAIER et al, 1994; SANFELICE, 2001) é provocada por sua ação direta sobre a mucosa que, através de um mecanismo desconhecido, aumenta a descamação. A associação dos achados de Sanfelice (2001), que mostraram redução na camada de ceratina, com os de Larentis et al (2000), que constatou maior número de células anucleadas e superficiais com núcleo nos raspados dos animais expostos ao etanol, reforçam essa afirmativa. Somam-se a estes os achados de Howie et al (2001), que igualmente observaram aumento do desprendimento de células da superfície epitelial. Outros estudos mostraram que, também ao longo do trato digestivo, o etanol é responsável por alterações nas

camadas mais externas do epitélio, dando sustentação a esta relação (BARAONA, PIROLA, LIEBER, 1975; ZUCOLOTO, ROSSI, 1979; MAK, LEO, LIEBER, 1987). Entretanto, alguns autores não comprovaram esta situação, pois utilizaram um tempo experimental curto (HAENTJENS, DE BAKER, WILLEMS, 1987).

Outra hipótese para explicar essa redução da espessura epitelial relatada na literatura é o estado de má nutrição dos animais que consomem etanol, como observaram Mak, Leo, Lieber (1987), ao pesquisarem a influência da deficiência de vitamina A sobre a mucosa do esôfago. Sanfelice (2001) descarta essa possibilidade, pois também observou redução da espessura epitelial no grupo aplicação tópica, que não teve ganho de peso diferente do grupo controle (ANEXO C). Maier et al (1994) puderam evidenciar esses mesmos resultados em animais com estado nutricional comparável ao dos animais do seu grupo controle (ANEXO C).

Em função disso, também não se pode assumir que esse aumento da descamação possa estimular o aumento da proliferação celular, conforme sugerem Baraona, Pirola e Lieber (1975) e Mak, Leo e Lieber (1987). Mesmo que esses fenômenos às vezes estejam presentes simultaneamente, não apresentam uma relação de causa-efeito, como mostraram Haentjens, De Baker e Willems (1987). Outra prova disso é o fato de Sanfelice (2001) ter observado redução da espessura epitelial nos animais que receberam aplicações tópicas e nos que ingeriram etanol e a proliferação ter aumentado apenas no último grupo.

O estímulo para o aumento da proliferação é a própria presença do acetaldeído, como se pôde observar através do trabalho de Homann et al (1997). Timmons, Nwankwo, Domann (2002) sugeriram que o mecanismo responsável por esse aumento envolveria o fator de transcrição AP1 e a proteína c-jun, intimamente ligados à regulação da proliferação celular. Uma vez que o acetaldeído pode ter origem no metabolismo do etanol no fígado, na mucosa

bucal ou a partir dos microrganismos da cavidade bucal, permanece a dúvida sobre qual dessas rotas estaria relacionada com as alterações.

A metodologia empregada neste estudo teve a intenção de avaliar o efeito local do etanol sobre a mucosa, através de aplicações tópicas que simularam bochechos com colutórios, e o efeito da ingestão contínua de etanol, que representa tanto uma ação direta, quanto indireta. Este estudo foi capaz de mostrar que a aplicação tópica e eventual do etanol causa somente um aumento da descamação, enquanto que sua ingestão prolongada está relacionada ao aumento da proliferação celular. Esses achados permitem concluir que, sendo esse aumento da proliferação provocado pela ação local ou sistêmica do etanol, ele só será observado a partir do seu uso freqüente e prolongado. Por outro lado, a influência do etanol na descamação independe da freqüência utilizada, como pôde mostrar Sanfelice (2001).

A partir dos trabalhos de Haentjens, De Baker, Willems (1987) e Tarnawski et al (1990) percebe-se que, algumas mucosas, como a do esôfago e do estômago, são mais sensíveis à ação do etanol, apresentando aumento da proliferação diante de uma menor dosagem. Ao longo do trato digestivo, os efeitos do etanol vão depender das características próprias das mucosas, como presença, quantidade e função das enzimas destinadas a sua degradação, e da concentração e forma de administração do etanol.

Os resultados obtidos apontam as células da camada suprabasal como as responsáveis pelo aumento da proliferação celular (tabela 4), confirmando os achados de Homann et al (1997) e Maito (2001). As células da camada basal não mostraram alteração em nenhum grupo, porque, fisiologicamente, já estão em constante ritmo de divisão. Portanto, na medida em que for necessária maior reposição celular, vão ser as células da camada suprabasal, usualmente com menor proliferação celular, as responsáveis pelo aumento do ritmo proliferativo. Da mesma forma, Simanowski et al (1986) mostraram que o aumento da proliferação em mucosa retal de ratos se deu pelo aumento do número de camadas que

expressavam PCNA, mostrando que a resposta à agressão pelo etanol é semelhante em diferentes porções do trato digestivo. Pode-se especular que nas células da camada basal os controles de proliferação são capazes de corrigir as agressões provocadas pelo uso do etanol. Em contrapartida, nas células da camada suprabasal, apesar de a agressão ser a mesma, os controles de proliferação são menos eficientes permitindo o seu aumento.

Neste estudo, o método da contagem das AgNORs foi mais sensível, pois foi capaz de identificar diferenças estatisticamente significantes onde a mensuração das áreas não encontrou. Isto vai de encontro ao postulado por Rüschoff et al (1990), Schwint et al (1993) e Carboneli et al (1994), que afirmam ser a mensuração das áreas um parâmetro mais sensível e confiável. Portanto pode-se afirmar que, quando há uma adequada calibragem dos examinadores, como nesse estudo (coeficiente kappa mínimo de 0,7), qualquer um dos métodos de quantificação podem ser utilizados.

Neste estudo, confirmam-se muitos dos resultados de Maito (2001), mostrando que, no seu estudo, a técnica do PCNA foi capaz de informar a respeito do processo de proliferação, assim como a técnica de AgNOR, discordando de Toschi, Bravo (1988) e Allison, Best (1998) que afirmam ser essa técnica pouco sensível. A confirmação do aumento da proliferação, através da utilização de dois diferentes marcadores, dá confiabilidade a esses resultados, seguindo a recomendação de Öfner et al (1995).

7. CONCLUSÕES

1. A ingestão de etanol, de forma contínua e após 12 meses, provoca um aumento da proliferação celular na mucosa lingual. Um período curto de acompanhamento pode gerar uma diminuição da proliferação celular, resultante do sofrimento celular.
2. A aplicação tópica de etanol, na forma e frequência utilizadas nesse estudo, não modifica a proliferação celular na mucosa lingual.
3. O aumento da proliferação celular provocado pelo consumo de etanol se dá às expensas das células da camada suprabasal.
4. As células da camada basal não modificam a sua atividade proliferativa diante da aplicação nem da ingestão do etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLISON, R.T.; BEST, T. p53, PCNA and Ki 67 Expression in Oral Squamous Cell Carcinomas: the Vagaries of Fixation and Microwave Enhancement of Immunocytochemistry. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.27, no.9, p.434-440, Oct. 1998.

ANTONY, S.; LEONG, M. B.; GILHAM, P. Silver Staining of Nucleolar Organizer Regions in Malignant Melanoma and Melanotic Nevi. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 20, no. 3, p. 257-262, Mar. 1989.

BARAKAT, N. J; TOTO, P. D.; CHOUKAS, N. C. Aging and Cell Renewal of Oral Epithelium. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 40, no. 1, p. 41-44, Jan., 1969.

BARAONA E., et al. Gender Differences in Pharmacokinetics of Alcohol. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, Baltimore, v. 25, no. 4, p. 502-507, Apr. 2001.

BARAONA, E.; PIROLA, R. C.; LIEBER, C. S. Acute and Chronic Effects of Ethanol on Intestinal Lipid Metabolism. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 388, no. 1, p. 19-28, Apr. 1975.

BERTELLI, M. S. et al. Alcoolismo em Caxias do Sul. **Rev. Cient. AMECS**, Caxias do Sul, v. 3, n. 1, p. 16-25, jan./july 1994.

BIRD, R. P. ; DRAPER, H. H. ; BASRUR, P. K. Effect of Malonaldehyde and Acetaldehyde on Cultured Mammalian Cells. Production of Micronuclei and Chromosomal Aberrations.

Mutat. Res., Amsterdam, v. 101, no. 3, p. 237-246, May 1982.

BUYS, C.; OSINGA, J. Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfide groups at chromosomal nucleolus organizing regions. **Chromosoma**, Berlin, v. 77, no. 1, p. 1-11, 1980.

CABRINI, R. L. et al. Morphometric Study of Nucleolar Organizer Regions in Human Oral Normal Mucosa, Papilloma and Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 21, no. 6, p. 275-279, July 1992.

CARBONELLI, D. L. et al. Nucleolar Organizer as a Marker of Incipient Transformation in a Model of Experimental Carcinogenesis. **Virchow Arch.**, Berlin, v. 425, no. 2, p. 165-170, May 1994.

CECCARELLI, C. et al. AgNOR in Breast Tumours. **Micron.**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 143-149. Apr. 2000.

CELENLIGIL-NAZLIEL, H. et al. The Effect of Age on Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression in Oral Gingival Epithelium of Healthy and Inflamed Human Gingiva. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 71, no. 10, p. 1567-1574, Oct. 2000. Buscar

CHATTOPADHYAY, A. ; CHAWDA, J. G. ; DOSHI, J. J. Silver – Binding Nucleolar Organizing Regions: a Study of Oral Leukoplasias and Squamous Cell Carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 23, no. 6, p. 374-377, Dec. 1994.

CLEATON-JONES, P. Mitotic Activity in the Oral Epithelium of the Albino Rat. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 55, no. 5, p. 859-863, Sept./Oct. 1976.

COLEMAN, H. G.; ALTINI, M., GROENEVELD, H. T. Nucleolar Organizer Regions in Odontogenic Cysts and Ameloblastomas. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 25, no. 8, p. 436-440, Sept. 1996.

COSTA, A. L. L. et al. PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR Double Staining in Oral Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 28, no.10 p. 438-441, Nov. 1999.

CROCKER, J. Nucleolar Organizer Regions. In.: UNDERWOOD, J. C. E.; CROCKER, J. (Ed). **Pathology of the Nucleus**. Berlin: Springer Verlag, 1990. p. 92-149.

CROCKER, J.; EGAN, M. J. Correlation Between NOR Sizes and Numbers in Non-Hodgkin Lymphomas. **J. Pathol.**, Chichester, v. 156, no. 3, p. 233-239, Nov. 1988.

CROCKER, J.; NAR, P. Nucleolar Organizer Regions in Lymphomas. **J. Pathol.**, Chichester, v. 151, no. 2, p. 111-118, Feb. 1987.

CROCKER, J. ; BOLDY, D. A. R. ; EGAN, M. J. How Should we Count AgNORs? Proposals for a Standardized Approach. **J. Pathol.**, Chichester, v. 158, no. 3, p. 185-188, July. 1989.

DERENZINI, M. The AgNORs. **Micron**, New York, v. 31, no. 2, p. 117-120, Apr. 2000.

DERENZINI, M.; PLOTON, D. Interphase Nucleolar Organizer Regions in Cancer Cells. **Int. Rev. Exp. Pathol.**, New York, v.32, p. 149-192, 1991.

DERENZINI, M.; PESSION, A.; TRÈRE, D. Quantity of Nucleolar Silver-Stained Proteins is Related to Proliferating Activity in Cancer Cells. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 63, no. 1, p. 137-140, July 1990.

DERENZINI, M. et al. The Quantity of Nucleolar Proteins Nucleolin and Protein B23 is Related to Cell Doubling Time in Human Cancer Cells. **Lab. Invest.**, Baltimore, v.73, no. 4, p. 497-502, Oct. 1995.

DERENZINI, M. et al. Nuclear Function and Size in Cancer Cells. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 152, no. 5, p. 1291-1297, May 1998.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar Size Indicates the Rapidity of Cell Proliferation in Cancer Tissue. **J. Pathol.**, Chichester, v.191, no. 2, p. 181-186, June 2000.

DONG, Y. J., PENG, T. K., YIN, S. –J. Expression and Activities of Class IV Alcohol Dehydrogenase and Class III Alcohol Dehydrogenase in Human Mouth. **Alcohol**, New York, v. 13, no. 3, p. 257-262, May/June 1996.

DU, X. et al. Penetration of N-Nitrosornicotine (NNN) Across Oral Mucosa in the Presence of Ethanol and Nicotine. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, no. 2, p. 80-85, Feb. 2000.

EGAN, M. J. et al. Nucleolar Organizer Regions in Small Cell Tumours of Childhood. **J. Pathol.**, Chichester, v. 153, no. 3, p. 275-280, Nov. 1987.

EGAN, M. J.; CROCKER, J. Nucleolar Organizer Regions in Cutaneous Tumours. **J. Pathol.**, Chichester, v. 154, no.3, p. 247-253, Mar. 1988.

ESPINA, N. et al. *In vitro* and *in vivo* Inhibitory Effect of Ethanol and Acetaldehyde on O⁶-Methylguanine Transferase. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 9, no. 5, p. 761-766, May 1988.

FONSECA, I.; SOARES J. Adenoid Cystic Carcinoma: a Study of AgNOR. **J. Pathol.**, Chichester, v. 169, no. 2, p. 255-258, Feb. 1993.

GIRI, D. D. ; NOTTINGHAM, J. F. ; LAWRY, J. Silver – Binding Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Benign and Malignant Breast Lesions: Correlations with Ploidy and Growth Phase by DNA Flow Cytometry. **J. Pathol.**, Chichester, v. 157, no. 4, p. 307-313. Apr. 1989.

GOLDIN, J. R. **Pesquisa em Saúde**: Leis, Normas e Diretrizes. Porto Alegre: GSI/ HCPA, 1997. 156p.

GOODPASTURE, C. ; BLOOM, S. E. Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Chromosomes Using Silver Staining. **Chromosoma**, Berlin, v. 53, no. 1, p. 37-50, Nov. 1975.

GUILLAUD, P.; WORZNIAK, Z.; SEIGNEUIN, D. Simultaneous Quantitation of DNA and Nucleolar Organizer Regions by Image Cytometry. **Anal. Quant. Cytol. Histol.**, Saint Louis, v. 15, no. 5, p. 351-357, Oct. 1993.

HAENTJENS, P.; DE BAKER, A.; WILLEMS, G. Effect of Apple Brandy from Normandy and of Ethanol on Epithelial Cell Proliferation in the Esophagus of Rats. **Digestion**, Paris, v. 37, no. 3, p. 184-192, July 1987.

HARTY, L. C. et al. Alcohol Dehydrogenase 3 Genotype and Risk of Oral Cavity and Pharyngeal Cancers. **J. Natl. Cancer Inst.**, Bethesda, v. 89, no. 22, p. 1698-1705, Nov. 1997.

HEINISCH, G.; BARTH, J. Nucleolus Organizer Regions as a Useful Proliferation Markers in Hiperproliferative Epidermal Lesions. **J. Europ. Acad. Derm. Venereol.**, Amsterdam, v. 5, no. 2, p. 139-145, Sept. 1995.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The Nucleolar Organizer Regions. **Biol. Cell.**, Paris, v. 49, no. 3, p. 191-202, 1983.

HILL, M. W. Epithelial Proliferation and Turn Over in Oral Epithelium and Epidermis with Age. In: SQUIER, C. A.; HILL, M.W. **The Effect of Aging in Oral Mucosa and Skin.** Boca Raton: CRC Press, 1994. 165p. Chap. 8, p. 65-74.

HOMANN, N. et al. Effects of Acetaldehyde on Cell Regeneration and Differentiation of the Upper Gastrointestinal Tract Mucosa. **J. Natl. Cancer Instit.**, Bethesda, v. 89, no. 22, p. 1692-1697, Nov.1997.

HOMANN, N. et al. Poor Dental Status Increases Acetaldehyde Production from Etanol in Saliva: A Possible Link to Increased Oral Cancer Risk Among Heavy Drinkers. **Oral Oncology**, Oxford, v. 37, no.2, p. 153-158, Feb. 2001.

HOWAT, A. J. et al. Silver –Stained Nucleoli and Nucleolar Organizer Region Counts are of no Prognostic Value in Thick Cutaneous Malignant Melanoma. **J. Pathol.**, Chichester, v. 156, no. 3, p. 227-232. Nov. 1988.

HOWIE, N. M. et al. Short-term Exposure to Alcohol Increases the Permeability of Human Oral Mucosa. **Oral Dis.**, Copenhagen , v. 7, no. 6 , p. 349-354, Nov. 2001.

HUBBELL, H. R. et al. Cell Cicle Analysis and Drug Inhibition Studies of Silver Staining in Synchronous HELA cells. **Exp. Cell Res.**, New York, v. 129, no. 1 p.139-147, Sept. 1980.

ISSELBACHER, K. J.; GREENBERGER, N. J. Metabolic Effects of Alcohol on the Liver. **N. Eng. J. Med.**, Walthan, v. 270, no.7, p.351-356, 1964.

IWAHASHI, K.; SUWAKI, H. Ethanol Metabolism, Toxicity and Genetic Polymorphism. **Add. Biol.**, Basingstoke, v. 3, no. 3, p. 249-259, July 1998.

JOHNSON, P. J. Acute and Chronic Liver Disease. In.: MARSHALL, W. J.; BANGERT, S. K. **Clinical Biochemistry**: Metabolic and Clinical Aspects. New York: Churchill Livingstone, 1995. 854 p. Cap.13, p.243-245.

LARENTIS, C. L. et al. Avaliação Citopatológica da Mucosa Bucal de Camundongos Fêmeas Submetidos ao Consumo e Aplicação Tópica de Álcool. In: Salão de Iniciação Científica da UFRGS, 12, 2000, Porto Alegre. **Resumos...**, Porto Alegre: UFRGS, 2000., P 325.

LAVELLE, C. L. B. The Effect of Age on the Oral Mucosa of the Rat (*Rattus Norvegicus*). **Dent. Pract. Dent. Rec.**, Bristol, v. 18, no. 10, p. 356-357, June 1968.

LEEK, R. D.; ALISON, M. R.; SARRAF, C.E. Variations in the Occurrence of Silver-Staining Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Non-Proliferating and Proliferating Tissues. **J. Pathol.**, Chinchester, v. 165, no.1, p. 43-51, Sept. 1991.

LIEBER, C. S. Biochemical and Molecular Basis of Alcohol-Induced Injury to Liver and Other Tissue. **N. Eng. J. Med.**, Waltham, v. 319, no. 25, p. 1639-1650, Dec. 1988.

LIPSCOMB, M. F. Doenças Ambientais. In: KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ROBBINS, S. L. **Patologia Básica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. 608 p. Cap. 8, p. 189-190.

LUNDY, J et al. The Acute and Chronic Effects of Alcohol on the Human Immune System. **Surg., Gynecol., Obstet.**, Chicago, v. 141, no. 2, p. 212-218, Aug. 1975.

MAIER, H. et al. The Effect of Chronic Ethanol Consumption on Salivary Gland Morphology and Function in the Rat. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, Baltimore, v. 10, no. 4, p. 425-427, July/Aug. 1986.

MAIER, H. et al. Effect of Chronic Alcohol Consumption on the Morphology of the Oral Mucosa. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, Baltimore, v. 18, no. 2, p. 387-391, Apr. 1994.

MAITO, F. D. M. **Avaliação da Expressão do PCNA no Epitélio Lingual de Camundongos Submetidos à Ingestão e Aplicação Tópica de Álcool à 40°GL.** 2001. 40 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MAK, K. M.; LEO, M. A.; LIEBER, C. S. Effect of Ethanol and Vitamin A Deficiency on Epithelial Cell Proliferation and Structure in the Rat Esophagus. **Gastroenterology**, Oxford, v. 93, no. 2, p. 362-370, Aug. 1987.

MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F. E., WATANABE, I. Morphological Changes on the Hard Palatine Mucosa of Rats (*Rattus Norvegicus Albinus*) After Chronic Alcohol Consumption. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Bologna, v. 30, no. 3, p. 379-384, July 1998.

MARTINEZ, M. et al. J. Morphological Effects on the Hard Palatine Mucosa of *Calomys Callosus* Submitted to Experimental Chronic Alcoholism. **Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Bologna, v. 34, no. 1, p. 77-83, Jan. 2002.

MASCRES, C.; JOLY, J.-G. Étude Histoquimique et Ultrastructurale de la Muqueuse Buccale du Rat, Après Administration Chronique d'Alcool. **J. Biol. Buccale**, Paris, v. 9, no. 3, p. 279-295, Sept. 1981.

MASCRES C., MING-WEN F., JOLY, J. G. Morphologic Changes of the Esophageal Mucosa in the Rat After Chronic Alcohol Ingestion. **Exp. Pathol.**, Jena, v. 25, no. 3, p. 147-153, 1984.

MIGALDI, M. et al. p 120 and AgNOR Nucleolar Protein Expression. A Comparison with Nuclear Proliferation Markers in Oral Pathology. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, Saint Louis, v. 85, no. 2, p. 189-196, Feb. 1998.

MILLER, D. A. et al. Suppression of Human Nucleolus Organizer Activity in Mouse - Human Somatic Hybrid Cells. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 101, no. 2, p. 235-243, Sept. 1976.

NAVASUMRIT, P. et al. Ethanol-Induced Free Radicals and Hepatic DNA Strand Breaks are Prevented *in vivo* by Antioxidants: Effects of Acute and Chronic Ethanol Exposure. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, no. 1, p. 93-99, Jan. 2000.

NEVES, M. M.; BORGES, D. R.; VILELA, M. P. Concentração de Etanol em Bebidas Alcoólicas Mais Consumidas no Brasil. **Gastroenterol. Endosc. Dig.**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 17-20, Jan.-Mar. 1989.

ÖFNER, D et al. Guidelines of AgNOR Quantification- First Update. **Virchows Arch**, Berlin, v. 427, no. 3, p. 341, 1995.

OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J.; RICE, P. Effect of Alcohol on the Oral Mucosa Assessed by Quantitative Cytomorphometry. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 28, no. 5, p. 216-220, May 1999.

PESTALOZZI, D. M. et al. Immunohistochemical Localization of Alcohol Dehydrogenase in the Human Gastrointestinal Tract. **Gastroenterology**, New York, v. 85, no. 5, p. 1011-1016, Nov. 1983.

PICH, A.; CHIUSA, L.; MARGARIA, E. Prognostic Relevance of AgNOR in Tumor Pathology. **Micron**, New York, v. 31, no. 2, p. 133-141, Apr. 2000.

PLOTON, D. et al. Improvement in the Staining and in the Visualization of the Argyrophilic Proteins of the Nucleolar Organizer Regions at the Optical Level. **Histochem. J.**, London, v. 18, no. 1., p. 5-14, 1986

PROTZEL, M.; GIARDINA, A. C.; ALBANO, E. H. The Effect of Liver Imbalance on the Development of Oral Tumors in Mice Following the Application of Benzpyrene or Tobacco Tar. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.**, Saint Louis, v.18, no.5, p. 622-635, July-Dec. 1964.

QUINN, C. M.; WIGHT, N. A. The Clinical Assessment of Proliferation and Growth in Human Tumours: Evaluation of Methods and Applications as Prognostic Variables. **J. Pathol.**, Chinchester, v. 160, no. 2, p. 93-102, Feb. 1990.

RAYMOND, W.A.; LEONG, A. S.-Y. Nucleolar Organizer Regions relate to growth fractions in human breast carcinoma. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 20, no. 8, p. 741-746, Aug. 1989.

RENNIE, J. S.; MacDONALD, D.G.; DAGG, J.H. Quantitative Analysis of Human Buccal Epithelium in Iron Deficiency Anaemia. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 11, no. 1, p. 39-46, Feb. 1982.

RIVEROS-ROSAS, H.; JULIAN-SANCHEZ, A.; PIÑA, E. Enzimology of Ethanol and Acetaldehyde Metabolism in Mammals. **Arch. Med. Res.**, México, v. 28, no. 4, p. 453-471, Winter 1997.

ROUSSEL, P ; HERNANDEZ-VERDUN, D. Identification of AgNOR Proteins, Markers of Proliferations Related to Ribosomal Gene Activity. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 214, no. 2, p. 465-472, Oct. 1994.

RÜSCHOFF, J. et al. Evaluation of Nucleolus Organizer Regions (NORs) by Automatic Image Analysis: a Contribution to Standardization. **J. Pathol.**, Chinchester, v. 161, no. 2, p. 113-118, June 1990.

SAAFELD, V. S.; SILVA, M. R. A. Prevalência do alcoolismo em cuidado primário à saúde. **Pesqui. Méd.**, Porto Alegre, v. 27, n.1, p. 5-9, 1993.

SANFELICE, J. C. **Alterações Morfológicas em Epitélio Lingual de Camundongos Expostos ao Álcool Etilico a 40° GL.** 2001, 67f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SANO, K. et al. Prognostic Implication of Silver – Binding Nucleolar Organizer Regions (AgNORs) in Oral Squamous Cell Carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 20, no. 2, p. 53-56, Feb. 1991.

SCHWARTZ, S. M. et al. Oral Squamous Cell Cancer Risk in Relation to Alcohol Consumption and Alcohol Dehydrogenase-3 Genotypes. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 10, no. 11, p. 1137-1144, Nov. 2001.

SCHWINT, A.E. et al. Nucleolar Organizer Regions as Markers of Incipient Cellular Alterations in Squamous Epithelium. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 72, no. 8, p. 1233-1236, Aug.

SCOTT, J. et al. A Quantitative Histological Analysis of the Effects of Age and Sex on Human Lingual Epithelium. **Jour. Biol. Buccale**, Paris, v. 11, no. 4, p. 303-315, Dec. 1983.

SCOTT, J. et al. Morphometric Analysis of Atrophic Changes in Human Lingual Epithelium in Iron Deficiency Anaemia. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 38, no. 9, p. 1025-1029, Sept. 1985

SCOTT, R. J. et al. A Comparison of Immunohistochemical Markers of Cell Proliferation with Experimentally Determined Growth Fraction. **J. Pathol.**, Chinchester, v. 165, no. 2, p. 173-178, Oct. 1991.

SIMANOWSKI, U. A. et al. Chronic Ethanol Consumption Selectively Stimulates Rectal Cell Proliferation in the Rat. **Gut**, London, v. 27, no. 3, p.278-82, Mar. 1986.

SIMANOWSKI, U. A. et al. Chronic Alcohol Consumption Enhances Rectal Cell Regeneration in Man. **Gastroenterology**, New York, v. 106, no. 4, p. A442, 1994 (ABSTRACT).

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, no. 2, p. 111-115, Mar.-Apr. 1995.

SIRRI, V. et al. Amount of the Two Major Ag - NOR Proteins, Nucleolin, and Protein B23 is Cell - Cycle Dependent. **Cytometry**, Baltimore, v. 28, no. 2, p. 147-156, June 1997.

SIRRI, V; ROUSSEL, P; HERNANDEZ - VERDUN, D. The AgNOR Proteins: Qualitative and Quantitative Changes During the Cell Cicle. **Micron**, New York, v. 31, no. 2, p. 121-6, Apr. 2000.

SMITH, M. E.; CRUCHLEY, A. T.; WILLIAMS, D. M. The Effect of Ethanol on the Penetration of Benzo(a)pyrene across human oral mucosa. **J. Dent. Res.**, v. 70, no. 4, p. 674, Apr. 1991 (ABSTRACT).

SPECTOR, D. L.; OCHS, R. L.; BUSCH, H. Silver Staining, Immunofluorescence, and Immunoelectron Microscopic Localization of Nucleolar Phosphoproteins B23 and C23. **Chromosoma**, Berlin, v. 90, no. 2, p. 139-148, 1984.

SQUIER, C. A.; FINKELSTEIN, M. W. Mucosa Bucal, p323-359. In: TEN CATE, A. R. **Histologia Bucal: Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 439p. Cap. 16, p. 323-339.

SQUIER, C. A.; WERTZ, P. W. Structure and Function of the Oral Mucosa and Implications for Drug Delivery. In: RATHBONE, M. J (Ed). **Oral Mucosal Drug Delivery**. New York: Marcel Dekker, 1996. 440p. Cap. 1, p.1-26.

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, no. 5, p. 276-279, May 1986.

SZABO, G. Consequences of Alcohol Consumption on Host Defence. **Alcohol Alcohol.**, Toronto, v. 34, no. 6, p. 830-841, Nov.- Dec. 1999.

TARNAWSKI, A. et al. Adaptation of Gastric Mucosa to Chronic Alcohol Administration is Associated with Increased Mucosal Expression of Growth Factors and Their Receptor.

Scand. J. Gastroenterology, Oslo, v. 193, no. 27, p. 59-63, 1990.

TEIXEIRA, G. et al. Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions Staining is Useful in Predicting Recurrence-Free Interval in Oral Tongue and Floor of Mouth Squamous Cell

Carcinoma. **Am. J. Surgery**, New York, v. 172, no. 6, p. 684-688, Dec. 1996.

THOMSON, A. D. Alcohol and Nutrition. **Clin. Endocrinol. Metab.**, London, v. 7, no. 2, p. 405-428, July 1978.

TIMMONS, S. R. ; NWANKWO, J. O. ; DOMANN, F. E. Acetaldehyde Activates Jun/AP-1 Expression and DNA Binding Activity in Human Oral keratinocytes. **Oral Oncology**, Oxford, v. 38, no. 3, p. 281-290, Apr. 2002.

TOIKKANEN, S. ; JOENSUU, H. AgNOR Counts Have No Prognostic Value in Breast Cancer. **J. Pathol.**, Chichester, v. 169, no. 2, p. 251-254, Feb. 1993.

TOSCHI, L.; BRAVO, R. Changes in Cyclin/ Proliferating Cell Nuclear Antigen Distribution During DNA Repair Synthesis. **J. Cell Biol.**, New York, v. 107, no. 5, p. 1623-1628, Nov. 1988.

TOTO, P. D. ; RUBINSTEIN, A. S.; GARGIULO, N. C. Labeling Index and Cell Density of Aging Rat Oral Tissue. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 54, no. 3, p. 553-556, May-June, 1975.

TRERÈ, D. AgNOR Staining and Quantification. **Micron**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 127-131, Apr. 2000.

TRERÈ, D. ; PESSION, A. ; DERENZINI, M. The Silver-Stained Proteins of Interphasic Nucleolar Organizer Regions as a Parameter of Cell Duplication Rate. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 184, no. 1, p. 131-137, Sept. 1989.

TRERÈ, D. et al. AgNOR Area in Interphase Nuclei of Human Tumours Correlates with the Proliferative Activity Evaluated by Bromodeoxyuridine Labelling and Ki67 Immunostaining. **J. Pathol.**, Chichester, v. 165, no.1, p. 53-59. Sept. 1991.

TRIGKAS, T. K. et al. Human Oral Mucosal Permeability is Increased by Short Time Exposure to Ethanol. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 72, no. 4, p. 694, Apr. 1993. (ABSTRACT)

VALENTINE, J. A. et al. A Histological Analysis of the Early Effects of Alcohol and Tabacco Usage on Human Lingual Epithelium. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 14, no. 8, p. 654-665, Sept. 1985.

WANG, J.-F.; SPITZER, J. J. Alcohol-Induced Thymocyte Apoptosis is Accompanied by Impaired Mitochondrial Function. **Alcohol**, New York, v. 14, no. 1, p. 99-105, Jan./Feb. 1997.

WILLIAMS, D. M.; CRUCHLEY, A. T. Structural Aspects of Aging in the Oral Mucosa. In: SQUIER, C. A.; HILL, M.W. **The Effect of Aging in Oral Mucosa and Skin**. Boca Raton, CRC Press, 1994. Chap. 7, p. 65-74.

YIN, S. -J et al. Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases in Human Esophagus. Comparison with the Stomach Enzyme Activity. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, Baltimore, v. 17, no. 2, p. 376-382, Apr. 1993.

YU, C. C.-Y. et al. A Comparison of Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) Immunostaining, Nucleolar Organizer Region (AgNOR) Staining, and Histological Grading in Gastrointestinal Stromal Tumours. **J. Pathol.**, Chinchester, v. 166, no. 2, p. 147-152, Feb. 1992.

YUE, L; IWAI, M.; FURUTA, I. Evaluation of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in Tongue Squamous Cell Carcinoma. **Oral Oncology**, Oxford, v. 356, no. 1, p. 70-76, Jan. 1999.

ZUCOLOTO, S.; ROSSI, M. A. Effect of Chronic Ethanol Consumption on Mucosal Morphology and Mitotic Index in the Rat Small Intestine. **Digestion**, Paris, v. 19, no. 5, p. 277-283, 1979.

ANEXO A

ANEXO B

Técnica Histoquímica de AgNOR:

Esta técnica de AgNOR foi desenvolvida baseada na técnica descrita por PLOTON *et al* (1986) e seguiu os seguintes passos:

- Desparafinização com xilol
- Desidratação com álcool etílico absoluto
- Pós-fixação em uma mistura de álcool etílico-ácido acético (solução de 3:1) por 10 minutos
- Lavagem em água destilada
- Impregnação pela Prata gotejando a solução coloidal sobre os cortes colocados em câmara úmida fechada e levados a estufa por 25 minutos a 45°C. A solução colóide de Prata deve ser preparada na hora de uso pela dissolução de 2% de gelatina em solução aquosa de ácido fórmico a 1%, misturado numa proporção de 1:2 partes com solução aquosa de nitrato de Prata em concentração de 50%.

Para 16 lâminas: 10ml de água + 0,2g de gelatina + 100µl de ác. Fórmico

20ml de água + 10g de AgNO₃

- Duas lavagens em água destilada aquecida a 45°C, para facilitar a remoção da gelatina e uma em água destilada na temperatura ambiente
- Reidratação em três banhos de álcool etílico absoluto
- Clareamento em xilol
- Montagem em Permount (Fisher ChemAlert®).

A técnica foi adaptada para a lesão Ceratocisto Odontogênico por Isabel Lauxen e Márcia Gaiger Oliveira. O tempo e temperatura de impregnação pela Prata devem ser adaptados conforme o tecido a ser estudado.

Laboratório de Patologia Bucal- Faculdade de Odontologia UFRGS

Fone: (051) 3316-5023

e-mail: ppgodo@vortex.ufrgs.br e marciago@ccs.ufsm.br

ANEXO C

Distribuição das médias dos pesos dos animais entre nos grupos estudados ao longo do tempo – Adaptado de Maito (2001) e Sanfelice (2001).

Comparação dos pesos dos camundongos no Grupo Controle, entre os tempos.

Peso	Média	Desvio-Padrão	Rank Médio	<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 estatisticamente significativas entre os pesos dos animais para os momentos estudados. Observa-se que os valores de pesos obtidos nos 3 momentos são progressivamente maiores, caracterizando o ganho de peso dos animais ao longo do experimento.

Comparação dos pesos dos camundongos no Grupo Ingestão, entre os tempos.

Peso	Média	Desvio-Padrão	Rank Médio	<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 estatisticamente significativas entre os pesos dos animais para os momentos estudados.

Comparação dos pesos dos camundongos no Grupo Aplicação Tópica, entre os tempos.

Peso	Média	Desvio-Padrão	Rank Médio	<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 estatisticamente significativas entre os pesos dos animais para os momentos

estudados. Observa-se que os valores de pesos obtidos nos 3 momentos são progressivamente maiores, caracterizando o ganho de peso dos animais ao longo do experimento.

Comparação dos pesos dos camundongos aos 6 meses de experimento, entre os grupos.

Peso	Média	Desvio-Padrão	Rank Médio	<i>p</i>
Inicial	38,11	3,27	28,82 ^A	0,01*
6 meses	33,68	2,85	8,55 ^B	
12 meses	36,73	3,20	26,53 ^C	

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Friedman, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os pesos dos animais para os grupos estudados. Observa-se que os valores de pesos obtidos no período de 6 meses para o Grupo Ingestão apresentam valores inferiores aos outros grupos estudados. Ao contrário dos animais dos Grupos Aplicação Tópica e Controle, que seguiram aumentando de peso, este praticamente mantiveram o seu peso do início do experimento.

Comparação dos pesos dos camundongos aos 12 meses de experimento, entre os grupos.

Peso	Média	Desvio-Padrão	Rank Médio	<i>p</i>
Inicial	42,92	3,08	34,58 ^A	0,01*
6 meses	35,74	3,52	18,00 ^B	
12 meses	42,75	3,99	27,00 ^A	

*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si.

Através dos resultados do teste não-paramétrico de Friedman, foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre os pesos dos animais para os grupos estudados. Observa-se que os valores de pesos obtidos no período de 12 meses para o Grupo Ingestão apresentam valores inferiores aos outros grupos estudados.

