

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

**QUANTIFICAÇÃO DA APOPTOSE EM EPITÉLIO LINGUAL
DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À INGESTÃO E AÇÃO TÓPICA
DO ÁLCOOL ETÍLICO A 40^o GL**

CRISTIANE CADEMARTORI DANESI

*Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do título de
Mestre em Odontologia, na área de Concentração de Patologia Bucal*

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

Porto Alegre, setembro de 2003

DEDICATÓRIA

Esta Dissertação é dedicada

A meus pais, **Clóvis** e **Lígia**: agradecê-los torna-se uma tarefa difícil por não encontrar palavras suficientes para expressar o que sinto. Dar-me-ei por realizada se conseguir ser metade do que são. Amo-os muito.

Aos meus irmãos, **César** e **Viviane** e cunhados, **Janice** e **Ronaldo**, pelo amor e amizade que nos une em todos os momentos.

Ao meu sobrinho **Gabriel**, por multiplicar o amor em nossos corações.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu querido orientador e amigo, Professor Doutor **Manoel Sant'Ana Filho**, pela oportunidade, pelo impulso e por ser chave da minha formação profissional, meu respeito e sincera gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela fé, pela esperança...

À minha avó **Marieta Alvarez Danesi**, uma pessoa iluminada. Você sempre fará parte de mim.

À minha querida madrinha **Laise Danesi Gallo**, que tem desempenhado com maestria as funções de segunda mãe, minha eterna gratidão.

Às minhas super amigas, **Pati, Fer, Ká, Carol, Dione e Cíntia**, pelo apoio. Adoro vocês.

Aos professores do Curso de Mestrado em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Profs. Drs. **João Jorge Diniz Barbachan, Onofre Francisco de Quadros, Pantelis Varvaki Rados e Anna Cecilia Chaves**, pelo estímulo recebido e convívio amplamente enriquecedor.

À Prof^a. Dr^a. **Anna Christina Fossati**, por quem devoto a mais profunda admiração.

À **Isabel da Silva Lauxen**, pelo auxílio nas atividades laboratoriais, sempre presente em todos os momentos em que solicitamos sua preciosa contribuição.

Aos Profs. do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria, especialmente ao Prof. Dr. **Marcos Martins Neto** e Prof. **Cezar Dalla Corte**, pelo exemplo, pelo apoio e pelo companheirismo que sempre recebi.

Aos colegas do Mestrado em Patologia Bucal, **Cristiano Macabu Badauy**, **Cristina da Silva Baumgart**, **Paula Luce Boher**, **Ricardo Losekan Paiva** e **Vinicius Coelho Carrard**, cuja compreensão e solidariedade foram indispensáveis à realização deste trabalho. Ele também lhes pertence.

Aos demais colegas do Mestrado e Doutorado, pelo agradável convívio, em especial a **Fernanda Z. Arruda**, **Mari Estela Kenner** e **Márcia Gaiger de Oliveira**.

À **Adriana Féres de Aguiar** e à **Rosemeri Siqueira Pedroso**, da secretaria do Pós-Graduação, pela presteza e amizade.

À Sr^a. **Marina Cordeiro Isaias**, pela alegria cativante de sempre.

A todos que, de alguma forma, contribuíram e não foram citados, mas nem por isso esquecidos.

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar quantitativamente a apoptose em células epiteliais submetidas ao etanol. Para tanto, foram formados três grupos de 10 animais: Grupo I ingeria álcool a 40° GL em substituição a água, durante todo período experimental; Grupo II recebia aplicações tópicas de álcool a 40° GL na cavidade bucal, duas vezes por semana, simulando um consumo eventual; e Grupo III, dieta livre. Para a investigação das células apoptóticas, utilizou-se a técnica de TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling). Foram analisadas as células das camadas basal, suprabasal e superficial do epitélio lingual, realizando comparações dentro dos mesmos grupos e entre os grupos. Através da análise estatística dos resultados, observou-se que, aos doze meses do experimento, houve aumento da apoptose na camada superficial do epitélio no grupo que ingeria álcool continuamente ($p=0,03$). Nos grupos controle e submetidos à aplicação tópica, não foram evidenciadas diferenças estatísticas significantes no índice de apoptose. Concluímos que a ingestão continuada do álcool aumenta o número de células em apoptose na camada superficial do epitélio lingual de camundongos, ao longo do tempo e leva a um comportamento epitelial, similar ao observado no epitélio senil.

ABSTRACT

The purpose of this study was to quantify apoptosis in epithelial cells exposed to alcohol. Three groups of 10 mice each were examined: the animals in Group 1 (continuous-intake group) ingested 40° GL alcohol instead of water during the experiment; in Group 2 (topical-exposure group), animals were submitted to topical applications of 40° GL alcohol on the dorsum of the tongue twice a week, which simulated moderate drinking; animals in Group 3 (control group) consumed a standard diet. The TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) technique was used to identify apoptotic cells. Basal, intermediate and superficial cells of the tongue epithelium were analyzed, and results were compared within and between groups. Statistical analysis of results revealed that apoptosis increased in the superficial epithelial layer in the continuous-intake group at 12 months ($p=0,03$). Apoptosis rates for the control and topical-exposure groups did not show any statistically significant differences. Our results suggest that continuous alcohol intake increases the number of apoptotic cells in the superficial epithelial layer of the tongue of mice, and accelerates cell ageing.

LISTA DE ABREVIATURAS

% - Expressa um valor em percentual

µm - Micrômetros

bcl-2 - Sigla em inglês de B-cell lymphoma/leukemia 2

c-myc - Sigla em inglês de cell-myc

DAB - Sigla em inglês de diaminobenzidine tetrahydrochloride

DNA - Ácido desoxirribonucléico

et al. - E outros

FEPPS - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

g - Grama

G0 - Fase da vida da célula durante a qual ela não está participando do processo proliferativo

G1 - Fase Gap 1 do ciclo celular

G2 - Fase Gap 2 do ciclo celular

GAC - Grupo Álcool Contínuo

GAT - Grupo Álcool Tópico

GC - Grupo Controle

H/E - Técnica Hematoxilina-Eosina

IL-4 - Sigla em inglês de interleukin-4

l - Litro

M - Fase do ciclo celular durante o qual a célula se divide

ml - Mililitros

mM - Milimolar

NHH - Sigla em inglês de Human Hepatocytes

NNN - Nitrosonornicotina

n^o - número

°C - Graus Centígrados

°GL - Graduação Alcoólica de Gay-Lussac

OH - Grupo funcional hidroxila ou oxidrila

OMS - Organização Mundial da Saúde

p - Indica o valor da probabilidade estatística

P.A. - Pró-Análise

p53 - Sigla em inglês de protein 53KDa

PBS - Sigla em inglês de phosphate-buffered saline

PCNA - Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

pH - Sigla em inglês de hydrogen ion concentration

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

S - Fase de síntese do ciclo celular

TdT - Sigla em inglês de Terminal deoxynucleotidyl Transferase

TGF α - Fator de crescimento transformante α

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TUNEL - Sigla em inglês de Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

W - Watts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia de lâmina do epitélio lingual de camundongo.

Espécime submetido à técnica de H/E40

Figura 2 - Fotomicrografia de lâmina do epitélio lingual de camundongo.

Espécime submetido à técnica de TUNEL40

Figura 3 - Fotomicrografia de lâmina do epitélio lingual de camundongo

do Grupo Álcool Contínuo, no tempo de doze meses.

Espécime submetido à técnica de TUNEL42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação entre os tempos para o grupo controle na camada basal	44
Tabela 2 - Comparação entre os tempos para o grupo controle na camada suprabasal	45
Tabela 3 - Comparação entre os tempos para o grupo controle na camada superficial	45
Tabela 4 - Comparação entre os tempos para o grupo álcool tópico na camada basal .	46
Tabela 5 - Comparação entre os tempos para o grupo álcool tópico na camada suprabasal	46
Tabela 6 - Comparação entre os tempos para o grupo álcool tópico na camada superficial	47
Tabela 7 - Comparação entre os tempos para o grupo álcool contínuo na camada basal	47

Tabela 8 - Comparação entre os tempos para o grupo álcool contínuo na camada suprabasal	48
Tabela 9 - Comparação entre os tempos para o grupo álcool contínuo na camada superficial	48
Tabela 10 - Comparação entre os grupos na camada basal no tempo inicial	49
Tabela 11 - Comparação entre os grupos na camada basal no tempo seis meses	49
Tabela 12 - Comparação entre os grupos na camada basal no tempo doze meses	50
Tabela 13 - Comparação entre os grupos na camada suprabasal no tempo inicial	50
Tabela 14 - Comparação entre os grupos na camada suprabasal no tempo seis meses	51
Tabela 15 - Comparação entre os grupos na camada suprabasal no tempo doze meses	51
Tabela 16 - Comparação entre os grupos na camada superficial no tempo inicial	52
Tabela 17 - Comparação entre os grupos na camada superficial no tempo seis meses	52

Tabela 18 - Comparação entre os grupos na camada superficial no tempo doze meses	53
Tabela 19 - Comparação entre as camadas no grupo controle no tempo inicial	54
Tabela 20 - Comparação entre as camadas no grupo controle no tempo seis meses	55
Tabela 21 - Comparação entre as camadas no grupo controle no tempo doze meses ...	56
Tabela 22 - Comparação entre as camadas no grupo álcool tópico no tempo inicial....	57
Tabela 23 - Comparação entre as camadas no grupo álcool tópico no tempo seis meses	58
Tabela 24 - Comparação entre as camadas no grupo álcool tópico no tempo doze meses	59
Tabela 25 - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo no tempo inicial	61
Tabela 26 - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo no tempo seis meses	62
Tabela 27 - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo no tempo doze meses	63

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Comparação entre as camadas no grupo controle no tempo inicial 55
- Gráfico 2** - Comparação entre as camadas no grupo controle no tempo seis meses 56
- Gráfico 3** - Comparação entre as camadas no grupo controle no tempo doze meses ... 57
- Gráfico 4** - Comparação entre as camadas no grupo álcool tópico no tempo inicial 58
- Gráfico 5** - Comparação entre as camadas no grupo álcool tópico
no tempo seis meses 59
- Gráfico 6** - Comparação entre as camadas no grupo álcool tópico
no tempo doze meses 60
- Gráfico 7** - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo
no tempo inicial 62
- Gráfico 8** - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo
no tempo seis meses 63

Gráfico 9 - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo

no tempo doze meses64

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS	11
INTRODUÇÃO	19
1 REVISÃO DE LITERATURA	21
2 PROPOSIÇÃO	33
3 METODOLOGIA	34
3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA	34
3.2 MATERIAL	34
3.2.1 <i>Obtenção da amostra</i>	34
3.2.2 <i>Caracterização da amostra</i>	37
3.3 MÉTODO	38
3.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA	39
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
4 RESULTADOS	44
4.1 COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS	44
4.1.1 <i>Comparação entre os Tempos para o Grupo Controle</i>	44
4.1.2 <i>Comparação entre os Tempos para o Grupo Álcool Tópico</i>	46

<i>4.1.3 Comparação entre os Tempos para o Grupo Álcool Contínuo</i>	47
4.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS	49
<i>4.2.1 Comparação entre os Grupos na Camada Basal</i>	49
<i>4.2.2 Comparação entre os Grupos na Camada Suprabasal</i>	50
<i>4.2.3 Comparação entre os Grupos na Camada Superficial</i>	52
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS CAMADAS	54
<i>4.3.1 Comparação entre as Camadas no Grupo Controle</i>	54
<i>4.3.2 Comparação entre as Camadas no Grupo Álcool Tópico</i>	57
<i>4.3.3 Comparação entre as Camadas no Grupo Álcool Contínuo</i>	61
5 DISCUSSÃO	65
CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	78

INTRODUÇÃO

A superfície da cavidade bucal é revestida por um epitélio pavimentoso estratificado, e o dorso da língua por uma mucosa especializada, onde cada camada ou estrato celular consiste de células, em estágios similares de maturação, com propriedades particulares e aspectos estruturais característicos, Mjor; Fejerskov (1990).

No epitélio, normalmente há um “estado de equilíbrio”. Isto significa que, num determinado período de tempo, o número de células formadas é balanceado pelo número de perdas. A proliferação epitelial é regionalmente pré-adaptada para funções antecipadas, Mjor; Fejerskov (1990).

Segundo Alberts et al. (1997), o mecanismo de morte celular que está relacionado com a homeostase na regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose, é denominado apoptose. Entretanto, também é relatado o papel da apoptose em uma série de processos patológicos, dentre os quais destacam-se os desencadeados por estímulos como o álcool, Slomiany; Piotrowski; Slomiany (2000), Colantoni et al. (2003).

Maier et al. (1994), avaliando o efeito do etanol sobre a morfologia da mucosa bucal de ratos através de análise morfométrica, concluíram que o consumo crônico do álcool causa

uma atrofia na mucosa bucal, seguida de intensa proliferação, associada a uma suscetibilidade aumentada aos efeitos de carcinógenos químicos.

Resultados coincidentes foram encontrados por Sanfelice (2001) e Maito (2001) que demonstraram que o álcool isoladamente foi capaz de promover modificações no epitélio lingual de camundongos, em especial no que diz respeito à proliferação desta, reduzindo a espessura do mesmo, bem como aumentando a expressão de células PCNA positivas, interpretada como maior atividade proliferativa.

Segundo Merimsky; Inbar (1999), os mecanismos exatos pelos quais o álcool exerce seu efeito nas mucosas permanece incerto. Várias sugestões têm sido elaboradas, tendo como base informações clínicas e trabalhos de laboratório; dentre eles, a perturbação da proteína p53 relacionada com a apoptose fisiológica.

Embora os mecanismos detalhados da apoptose ainda não estejam totalmente compreendidos, um grande avanço ocorreu desde a descrição inicial dos mesmos. Sabe-se que é mecanismo biológico freqüente e de grande importância no controle de qualidade e quantidade de células e tecidos biológicos de diferentes espécies animais, estando altamente conservado nos humanos, Rocha (1999).

A partir dos trabalhos de Maito (2001) e Sanfelice (2001), portanto, pretendeu-se investigar o efeito do consumo de álcool em epitélio do dorso da língua de camundongos que foram submetidos a ingestão e ação tópica de álcool a 40° GL, durante o período de 12 meses.

1 REVISÃO DE LITERATURA

Os pensamentos sobre incidência e mecanismos de morte celular foram, durante muito tempo, avaliados através de uma visão restrita, como um fenômeno degenerativo produzido por dano celular. Este conceito faz parte da história da patologia celular a partir de Virchow em 1858, Lichtenfels; Barrios; Moreira (1999).

Atualmente, a morte celular é classificada em dois tipos básicos: necrose e apoptose. A primeira, muito estudada e definida, acontece acidentalmente, como resultado de injúria aguda, onde as células geralmente incham e explodem. A segunda, objeto das pesquisas mais atuais, faz parte de um programa fisiológico no qual a célula e seu núcleo encolhem, condensam e se fragmentam, Wyllie; Kerr; Currie (1980), Lourenço, Melo, Consolaro (1997), Alberts et al. (1997), Junqueira, Carneiro (2000).

Enquanto as células que morrem por necrose liberam os seus conteúdos citosólicos no espaço extracelular e induzem uma resposta inflamatória, as células que morrem por apoptose originam vesículas revestidas por membranas, que são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos (ou outras células vizinhas); desta forma, não há liberação de componentes citosólicos nem resposta inflamatória, Alberts et al. (1997).

Segundo Lichtenfels; Barrios; Moreira (1999), a apoptose é considerada um processo de morte celular ativo, com gasto energético e controlado geneticamente, sendo essencialmente distinto da morte celular por necrose. Nesta última, o mecanismo é disparado sem intervenção ativa da célula, sem gasto energético e com ausência de transcrição gênica.

O termo apoptose foi sugerido por Kerr, Willie e Currie, em 1972, ao observarem células morrendo em condições fisiológicas e patológicas partilhando de características morfológicas próprias; porém, somente no início da década de 90, tal processo começou a ser intensamente investigado.

Esse fenômeno pode ser observado em processos biológicos normais, tais como a embriogênese, a maturação e diferenciação celular e a eliminação de células com lesões genéticas, mas pode estar envolvido, também, em situações patológicas, como as doenças tumorais, imunes, virais, degenerativas e em lesões produzidas por uma variedade de estímulos lesivos que são capazes de produzir necrose, mas, quando em baixas doses, induzem a apoptose, Cotran; Kumar; Robbins (1996), Delfino et al. (1997), Colantoni et al. (2003).

Inúmeros termos têm sido utilizados como sinônimos de apoptose; dentre eles, destacam-se morte celular geneticamente determinada, Majno; Joris (1995), morte celular induzida, Hockenbery (1995), morte celular programada, morte celular normal, suicídio celular, Alberts et al. (1997), morte celular fisiológica, morte celular patológica, Delfino et al. (1997), morte celular organizada, Rocha (1999) e morte associada a caspase, Thornberry; Lazebnik (1998).

Foi publicada, recentemente, uma análise conceitual sobre a adequação das denominações correntes para referir-se a este tipo de morte celular. Os autores destacaram que o termo apoptose como sinônimo de morte celular programada é, atualmente, empregado de forma inadequada, pois não indica o tipo de morte que acometeu a célula. O termo morte celular programada refere-se aos eventos ocorridos durante o desenvolvimento de diferentes órgãos e tecidos (morfogênese de tecidos embrionários), enquanto que o termo apoptose é proposto para a morte celular que ocorre na homeostasia de tecidos e órgãos adultos, mantendo a massa celular e eliminando o excesso ou células sem função, bem como eliminando células danificadas, Wang; Wang (1999).

Durante muito tempo encarada como simples curiosidade, a apoptose vem merecendo atenção cada vez maior por sua participação em uma variedade ampla de circunstâncias fisiológicas e patológicas, Lourenço; Melo; Consolaro (1997), Mishima; Nariai; Yoshimura (2003).

A maioria dos tecidos sofre um constante processo de renovação celular, mantendo o número de células graças ao equilíbrio existente entre contínua proliferação e morte das células. Neste caso, de acordo com Junqueira; Carneiro (2000), trata-se de uma forma fisiológica normal de morte celular, conhecida como apoptose.

Este processo é evidente nos epitélios estratificados queratinizados, onde a célula sofre evolução progressiva e sua descamação é demonstrável, Hadler; Silveira (1993).

Segundo Weisfelner; Gottlieb (2003), a similaridade e a distinção entre diferenciação terminal e apoptose em queratinócitos tem sido muito discutida.

Existem indícios de que processos especializados de diferenciação, como os que ocorrem com os queratinócitos, são, na realidade, formas modificadas de apoptose, Mass et al. (2003).

Para Horta; Young (1999), os queratinócitos, células da camada externa da pele, ao migrarem de camadas mais profundas para a superfície, morrem por apoptose, mas no processo, substituem seu conteúdo pela proteína queratina e ganham uma “capa” impermeável. Assim, a camada protetora mais externa da pele é feita de células mortas, descamadas e trocadas por outras a cada 21 dias, em média. Segundo Hadler; Silveira (1993), no epitélio queratinizado das mucosas, o processo de queratinização é ligeiramente mais rápido.

O processo de apoptose mostra vários estágios, sendo que Wyllie (1987) dividiu-o em três fases. Na primeira fase, mais difícil de ser reconhecida, a cromatina torna-se agregada em grandes massas granulares compactas adjacentes à membrana nuclear. Concomitantemente a estas alterações nucleares, o citoplasma também inicia um processo de condensação. Ocorrem diminuição do volume total da célula, aumento da densidade celular e compactação das organelas citoplasmáticas. Vacúolos claros são numerosos no citoplasma e algumas vezes parecem descarregar seu conteúdo por exocitose, Wyllie (1987).

Na segunda fase, ocorre a fragmentação do DNA, resultante de clivagens entre os nucleossomos e fragmentação nuclear em pequenos núcleos, o que dá à célula um aspecto granulado. Posteriormente, a célula fragmenta-se em vesículas revestidas por membranas denominadas corpos apoptóticos, Junqueira; Carneiro (2000). Estes corpos possuem forma

esférica ou ovóide, sendo que o número, o tamanho e a composição dos mesmos variam amplamente, Iwanaga et al. (1994).

Na última fase, esses fragmentos são extruídos para dentro da luz adjacente dos órgãos (quando presentes) ou, mais comumente, são reconhecidos e fagocitados por macrófagos ou por células vizinhas, Junqueira; Carneiro (2000). Os fagossomas contendo corpos apoptóticos adquirem enzimas digestivas pela fusão com lisossomas primários e secundários, Kerr; Searle (1972).

Dessa forma, as células que morrem por apoptose são removidas do tecido sem que haja extravasamento de conteúdo celular, o que, normalmente, é causa de inflamação, Cotran; Kumar; Robbins (1996), Lourenço; Melo; Consolaro (1997).

Excepcionalmente, alguns tipos celulares que sofrem apoptose não são removidos rapidamente, continuando no local durante um maior período de tempo. É o caso dos queratinócitos, Horta; Young (1999).

Os mecanismos desse tipo de morte celular ainda não são bem conhecidos. Dados experimentais *in vitro* mostram que o processo é ativo e depende de energia e de síntese protéica. Há participação de receptores específicos na membrana para receber o sinal, o qual é transduzido para o citoplasma e daí, para o núcleo, onde há ativação de genes que iniciam os mecanismos responsáveis pela morte programada. Estes genes induzem a síntese e a ativação de uma endonuclease (dependente de cálcio e magnésio) e de uma transglutaminase. A endonuclease causa a fragmentação internucleossômica do DNA, enquanto a transglutaminase aumenta as ligações cruzadas das proteínas celulares, elevando a estabilidade da membrana

plasmática e limitando, assim, o vazamento de constituintes citoplasmáticos durante a fragmentação celular em corpos apoptóticos, Alberts et al. (1997).

Em 1992, Gavrieli, Sherman e Ben-Sasson desenvolveram um método para marcação *in situ* do DNA fragmentado no núcleo, em tecidos cortados e processados na histotécnica de rotina. O método baseia-se na ligação específica de um terminal deoxinucleotídeo transferase (TdT) a uma cadeia terminal 3'-OH do DNA, resultando na síntese de um polímero polideoxinucleotídeo. Inicialmente, os cortes microscópicos recebem um tratamento proteolítico para expor o DNA nuclear; em seguida, a enzima TdT é usada para incorporar biotinylated deoxyuridine em sítios de DNA quebrado. O sinal é ampliado por uma peroxidase conjugada com avidina, que permite a identificação em microscopia de luz e estipula, ainda, um padrão distinto de coloração no núcleo. Este método é denominado de técnica de TUNEL, que significa: método mediado pelo TdT dUtp-biotin Nick End Labeling. O método de TUNEL baseia-se na marcação direta e específica do DNA fragmentado no núcleo.

Com o advento da biologia molecular, o estudo da morte celular programada atingiu o campo da genética molecular, onde tem sido observada a presença de vários genes envolvidos no controle da morte celular programada. Tais genes estão começando a ser identificados e os estudos sobre eles estão cada vez mais avançados. Todos estes genes estão presentes em equilíbrio nas células, sendo ativados diante de estímulos através de um mecanismo ainda desconhecido, Lourenço; Melo; Consolaro (1997).

Diferentes sinais provenientes do meio intra ou extracelular podem desencadear o processo de apoptose nas células. Entre estes sinais, incluem-se informações da própria

linhagem, fatores de crescimento ou sobrevivência extracelular, interações celulares e hormônios, Steller; Grether (1994), bem como danos às células provocados por estímulos brandos, como radiações ionizantes, infecção viral, toxinas, Segreto et al. (1998) e também pelo álcool, Slomiany et al. (1998), Colantoni et al. (2003), Nakahara et al. (2003).

Estes sinais podem agir, tanto suprimindo, como ativando o programa de apoptose, sendo que o mesmo sinal pode produzir efeitos opostos em diferentes tipos celulares, Truman; Schwartz (1984).

Segundo Ayala et al. (1995), outro fator a ser levado em consideração é a idade da célula, uma vez que células senis apresentam uma maior suscetibilidade à apoptose.

Para Katz et al. (2001), a indução da apoptose pelo etanol é um processo complexo onde estão envolvidos, além da ativação de gens (p53, bcl-2, c-myc), vários outros fatores, incluindo expressão de citocinas reguladoras, ativação de caspases e outros efeitos diretos do etanol no DNA e na mitocôndria. A ligação entre estes fatores envolvem caminhos iniciais de ativação de caspases, associada à colaboração de outros caminhos como a ativação de TNF α pelo etanol, que causam ativação de caspases secundárias e desregulação da síntese de DNA.

Kasagi (1999) analisou a expressão de proteínas das moléculas p53, bcl-2 e c-myc em células de carcinoma gástrico após 1,5 horas do tratamento (exposição) com etanol a 3%, a 5% e a 10%. Os resultados deste estudo evidenciam necrose destas células frente à ação do etanol a 10%. Em concentrações menores, 3% e 5%, não foram observadas alterações nos níveis de expressão de p53 e de c-myc, porém bcl-2 estava mais elevado. Este fato confere a resistência destas células a apoptose induzida pelo etanol a 3% e a 5%.

Em outro estudo, Katz et al. (2001), ao mensurarem a apoptose através da técnica de TUNEL em cultura de hepatócitos humanos, tratados com 100mM/l de etanol por 24 horas e com duas doses consecutivas de 100mM/l de etanol por 24 horas, cada, observaram, no primeiro grupo, um aumento do índice de apoptose de 22% ($p < 0.001$ vs. control), enquanto que, no segundo, o aumento foi de 36% ($p < 0.001$ vs. control e $p < 0.05$ vs. previous dose).

Resultados semelhantes foram encontrados por Slomiany et al. (1998) ao investigarem a fragmentação do DNA, bem como a expressão de TNF em células epiteliais da mucosa bucal de ratos mantidos, por 23 dias, em contato com álcool e com uma dieta de líquido controle. Os resultados demonstraram aumento da fragmentação do DNA e intensificação da expressão de TNF α , evidenciando uma maior suscetibilidade destas células a apoptose induzida pelo álcool.

Slomiany; Piotrowski; Slomiany (2000), ao estudarem os efeitos da ingestão crônica de álcool na mucosa bucal de ratos mantidos por cinco semanas em contato com dieta contendo álcool, também observaram um aumento de TNF α nas células epiteliais no grupo da dieta com álcool, fato este interpretado como um aumento no índice de apoptose.

Em síntese, o etanol tem sido implicado como um mensageiro para sinalizar caminhos envolvidos na apoptose, Katz et al. (2001), Colantoni et al. (2003).

Para Freund (1979), a administração aguda ou crônica de álcool induz mudanças em todos os níveis da organização biológica, percorrendo os níveis moleculares e comportamentais. Por outro lado, não está bem esclarecido se o álcool produz seus efeitos topicamente, na cavidade oral, para produzir mudanças epiteliais, ou se ele age

sistemicamente, via alterações no metabolismo hepático, no sistema imune, ou ainda no metabolismo de vitaminas, Wright; Binnie; Wright (1988).

McCoy; Wynder (1979), Squier; Cox; Hall (1986) e Howie et al. (2001) descreveram que o álcool, em contato direto com a membrana da célula, exerce um efeito na bicamada fosfolipídica, agindo como solvente, podendo remover algum conteúdo lipídico.

Para Howie; Cruchley; Williams (1995), esta remoção do conteúdo lipídico torna a mucosa mais permeável a moléculas de alto peso molecular, bem como, segundo Squier; Cox; Hall (1986) e Du et al. (2000), é responsável pela diminuição da espessura do epitélio.

Vários estudos confirmam a afirmativa acima. Squier; Cox; Hall (1986), por meio de um sistema de perfusão *in vitro*, observaram que concentrações de etanol acima de 5% e menores que 50% aumentam a permeabilidade da mucosa oral à NNN (Nitrosomonocotina – carcinógeno do tabaco - e outros, também), representando um maior risco para o desenvolvimento de câncer em tabagistas e etilistas. Já a concentração de 50% não alterou significativamente a permeabilidade devido ao provável efeito fixador do álcool.

Oliveira et al. (1994), ao avaliarem o resultado do alcoolismo materno no epitélio lingual de fetos de ratos, encontraram, nos grupos consumidores, uma significativa redução na espessura do mesmo na região estudada (dorso de língua). Tais autores concluíram que esta redução pode significar suscetibilidade maior na direção de uma atuação local de carcinógenos químicos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Maier et al. (1994) e Wight; Ogden (1998) ao relatarem que o efeito do consumo crônico do álcool na morfologia da mucosa bucal de ratos, por meio da análise morfométrica, resultou em atrofia, seguida de hiper-regeneração, induzida pelos efeitos citotóxicos do álcool.

Sanfelice (2001) verificou uma redução na medida da espessura do epitélio do dorso de língua de camundongos, expostos ao álcool no tempo de 06 e 12 meses. Já Maito (2001), avaliando a expressão do PCNA no mesmo modelo experimental, observou um aumento da proliferação celular da camada intermediária ao longo do tempo e isso foi interpretado como a persistência das células no ciclo celular.

Para Wight; Ogden (1998), a atividade do etanol sobre a mucosa bucal pode não ser só local, mas também resultante de efeitos sistêmicos associados ao consumo crônico de álcool.

Koch (1977), Mincis; Pereira; Ferrari (1982), Seixas (1975) e Tetu; Grein; Campelli (1977), relataram que, nos casos de cirrose hepática com deficiência do metabolismo do fígado devido ao uso crônico do álcool, houve alterações estruturais e metabólicas na mucosa bucal predispondo-a, mais intensamente, à ação dos outros elementos co-carcinógenos e carcinógenos.

McCoy; Wynder (1979) sugeriram, também, a possibilidade de o dano no fígado diminuir sua capacidade de desintoxicação de potenciais carcinógenos. Como consequência da perda da capacidade metabólica do fígado, há aumento da concentração sistêmica de carcinógenos que podem agir sobre os tecidos alvos, numa proporção maior do que ocorre em indivíduos sem comprometimento hepático.

Graham; Rennie, em 1987, sustentaram a afirmativa de que o uso crônico do álcool leva a uma alteração hepática; ao verificarem os níveis da enzima Y-glutamil transpeptidase - considerada melhor marcador para danos no fígado - no soro de ratos alimentados com dieta líquida contendo 36% do valor calórico de álcool. Os níveis dessa enzima também foram medidos e comparados com os níveis dos ratos, considerados controle que ingeriram dieta usual. Esses autores verificaram que os níveis da enzima Y-glutamil transpeptidase foram maiores nos animais submetidos à ingestão da dieta contendo etanol, caracterizando alterações da função hepática.

Mincis; Pereira; Ferrari (1982) e Palmer (1978) admitiram que outros fatores, como deficiência nutricional ou má nutrição decorrentes do uso crônico do álcool, também atuaram de forma indireta sobre a mucosa, causando mudanças nos tecidos da cavidade bucal, tornando-os mais susceptíveis à ação dos agentes co-carcinogênicos e carcinogênicos.

Para Palmer (1978) e Kovacs; Messingham (2002), o álcool ainda pode agir interferindo na função imunológica, com conseqüente diminuição ou atraso na defesa do organismo.

Através de alterações celulares que podem causar e ou predispor o etanol já é apontado como um iniciador do processo de carcinogênese, Maier; Weidauer (1995), Simanowski et al. (1995), Born et al. (1996), Slomiany et al. (1998) e Wang (2003).

A proliferação celular alterada é uma das características que difere o câncer do tecido normal; logo, é importante entender a renovação celular na mucosa normal, durante a carcinogênese e em carcinomas já instalados, para poder desenvolver e avaliar novas medidas

terapêuticas. Nos últimos anos, tem-se atentado mais para a biologia molecular, ciclo celular e seus eventos na regulação da proliferação das células, Simanowski et al. (1995).

Estudos mostram que existe uma relação íntima entre a proliferação celular e a apoptose, uma vez que um estímulo ou inibição destes mecanismos levam a um aumento ou diminuição da população celular. Logo, a regulação da apoptose é tão importante quanto a regulação da proliferação celular, Cotran; Kumar; Robbins (1996).

Conforme Lichtenfels; Barrios; Moreira, (1999) um melhor entendimento a respeito do processo apoptótico ampliará os conhecimentos no campo biológico e molecular, sendo que as perspectivas futuras apontam para uma maior utilização dos métodos de biologia molecular no sentido de auxiliar definições diagnósticas (rastreamento molecular) ou mesmo terapêuticas. Em suma, entender melhor a morte pode nos trazer lições valiosas a respeito da preservação da vida.

2 PROPOSIÇÃO

OBJETIVO GERAL

De acordo com os aspectos expostos e com os resultados obtidos por Maito (2001) e Sanfelice (2001), pretendeu-se investigar o efeito do consumo de álcool em epitélio do dorso da língua de camundongos submetidos a ingestão e ação tópica de álcool a 40° GL, durante o período de 12 meses, avaliando a participação quantitativa da apoptose.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar, nos tempos inicial, seis e doze meses do experimento, o número total de células epiteliais TUNEL positivas, relacionando:

1. Os dados dentro do próprio grupo, através do tempo.
2. Os grupos entre si, através do tempo.
3. As camadas epiteliais nos diferentes grupos e tempos.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

A pesquisa desenvolvida foi prática laboratorial, quantitativa, com um *design* descritivo correlacionado. O presente estudo foi classificado como experimental, controlado por placebo, cego e randomizado, utilizando um desenho experimental em paralelo.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Obtenção da Amostra

Do trabalho experimental desenvolvido por Maito (2001) e Sanfelice (2001), que consistiu em submeter grupos de camundongos a variáveis de exposição ao álcool, originou-se a amostra desse experimento. A metodologia utilizada no referido estudo segue transcrita.

Foram utilizados 60 camundongos (*Mus domesticus domesticus*), da linhagem CF1, fêmeas, híbridas, 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 randomizada e divididos em três grupos com 20 animais cada. O primeiro, identificado como Grupo Controle (GC), foi submetido a dieta usual à vontade (*ad libitum*), com ração própria para camundongos, marca NUVILAB/CR1 e água. O segundo foi identificado como Grupo Álcool Contínuo (GAC), ingeriu, à vontade, álcool a 40° GL (Álcool etílico, P.A. - etanol absoluto marca Reagen - fabricante Quimibrás Indústrias Químicas S.A. - Rio de Janeiro - RJ) em substituição à água durante todo o experimento e a ração foi fornecida da mesma forma que a do primeiro grupo. O terceiro, identificado como Grupo Álcool Tópico (GAT), foi submetido a dieta usual à vontade (*ad libitum*), com ração própria para camundongos, marca NUVILAB/CR1 e água, porém foi acrescentada a variável aplicação tópica de álcool a 40° GL na cavidade bucal, duas vezes por semana. Essa aplicação foi realizada com uma seringa de insulina (volume de 1ml), sem agulha, com o animal mantido de cabeça para baixo com tracionamento da pele da parte posterior do pescoço de modo que ele se mantivesse de boca aberta, evitando a ingestão do álcool. A aplicação do álcool foi feita de uma só vez, esvaziando toda a seringa na cavidade bucal do animal, em um tempo aproximado de 3 segundos. Não se fazia uso de analgesia para tal procedimento.

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

Os animais foram submetidos a coleta de material para exame através da remoção de uma amostra da mucosa lingual (dorso), utilizando-se um “punch” de biópsia de 03 mm de

diâmetro (*Biopsy Punch* – fabricante *Stiefel Laboratorium GmbH* – importado e distribuído por Laboratórios Stiefel Ltda.- Guarulhos – SP) e um cabo de bisturi – modelo Bard-Parker, montado com uma lâmina nº 12, sendo a amostra (peça cirúrgica) colocada com seu lado cruento sobre papel absorvente e fixada em formalina neutra tamponada a 10% por 24 horas. Para este procedimento os animais foram sedados por inalação de éter (Éter Sulfúrico Techn – Importadora Química Delaware Ltda.). Esta coleta foi realizada no 1º (inicial), no 6º e no 12º mês do experimento, totalizando três coletas.

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

As peças fixadas em formalina, passadas 24 horas de fixação, foram processadas para inclusão em parafina histológica, utilizando-se o equipamento histotécnico marca OMA, modelo CM 69.

Este trabalho esteve de acordo com a Declaração Universal dos Direitos Animais e os princípios éticos na experimentação animal emitidos pelo Código Brasileiro de Experimentação Animal, conforme Goldim (1997), tendo sido submetido à avaliação do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cujo parecer está apensado no anexo A.

3.2.2 Caracterização da Amostra

Probabilística, aleatória, constituída por 90 blocos de parafina, arquivados no Laboratório de Patologia Bucal da UFRGS.

Os blocos de parafina foram divididos em três grupos, de acordo com a frequência de ingestão de álcool, da seguinte maneira:

GRUPOS	PERÍODO INICIAL	APÓS 6 MESES	APÓS 12 MESES
GC	10	10	10
GAT	10	10	10
GAC	10	10	10

GC: Constituído por blocos oriundos de animais do grupo controle.

GAC: Constituído por blocos oriundos de animais do grupo álcool contínuo.

GAT: Constituído por blocos oriundos de animais do grupo álcool tóxico.

3.3 MÉTODO

Os blocos de parafina foram seccionados em um micrótomo Leica - Modelo RM 2155, com espessura de 4 μ m e montados em lâminas sialinizadas (Dako[®]), obtendo-se 1 lâmina de cada espécime.

Para detecção e quantificação do item proposto, foi realizada a técnica de TUNEL (Terminal deoxinucleotidil transferase Uracil Nick End Labeling), utilizando-se o “kit” In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche[®]) designado a marcar fragmentos de DNA oriundos da clivagem do mesmo, que ocorre durante o processo de apoptose. A descrição da técnica segue no anexo B.

Com o objetivo de otimizar a técnica, foi utilizado 1 camundongo (*Mus domesticus domesticus*), da linhagem CF1, fêmea, hígida, virgem e heterogênica, com 2 meses de idade, adquirido na Divisão de Produção e Experimentação Animal da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde – FEPPS, do qual foi removido o timo e o cerebelo, órgãos com alto e baixo índice de apoptose, respectivamente.

Os controles da reação foram realizados em cortes do timo do animal anteriormente descrito. Para o controle positivo, seguiu-se o mesmo procedimento descrito no anexo B; já no controle negativo, não foi aplicada a enzima TdT, conforme orientação do fabricante do “kit” In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche[®]).

A observação das células em apoptose foi realizada com microscópio óptico binocular em aumento de 400X. A localização dos campos e a quantificação das células epiteliais

submetidas à técnica de TUNEL foram avaliadas utilizando-se o Sistema de Processamento e Análise de Imagens - IMAGE TOOL[®] - versão 3.0, instalado em um computador marca UNISYS- Modelo Aquanta DX (Processador Pentium MMX 200MHz, 64Mb de memória RAM- Sistema Operacional Microsoft Windows 95- Monitor LG modelo Studioworks 57M, 15 polegadas, colorido) associado a um microscópio binocular marca Zeiss - Modelo Standart 20, com câmara de vídeo marca JVC com 1 CCD, modelo TK-C620U, colorida, acoplada para captação de imagens microscópicas.

3.4 ANÁLISE MICROSCÓPICA

A avaliação consistiu na análise quantitativa discreta do número total de células das camadas basal e suprabasal do epitélio, bem como das células apoptóticas das camadas basal, suprabasal e superficial. Foram consideradas células da camada basal aquelas que estavam em contato com o tecido conjuntivo subjacente e que apresentavam núcleo colunar. As camadas celulares adjacentes à basal foram denominadas suprabasal, enquanto a superficial foi definida como a camada de células com núcleo fusiforme localizada abaixo da camada queratinizada, conforme figuras 1 e 2.

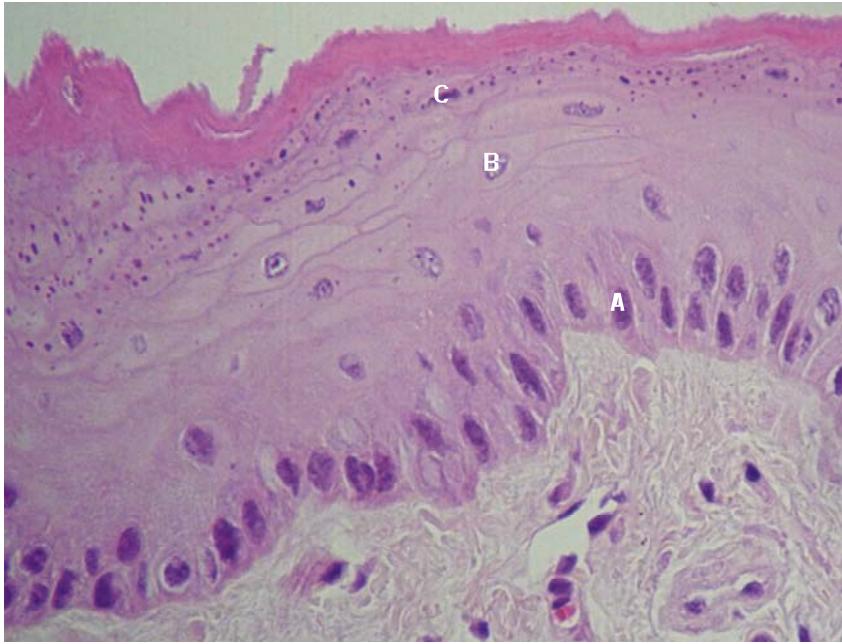


Figura 1: Fotomicrografia do epitélio lingual de camundongo.

Espécime submetido a técnica de H/E. [A = Célula da camada basal;
B = Célula da camada suprabasal; C = Célula da camada superficial]
(microscopia de luz; aumento \cong 400X)

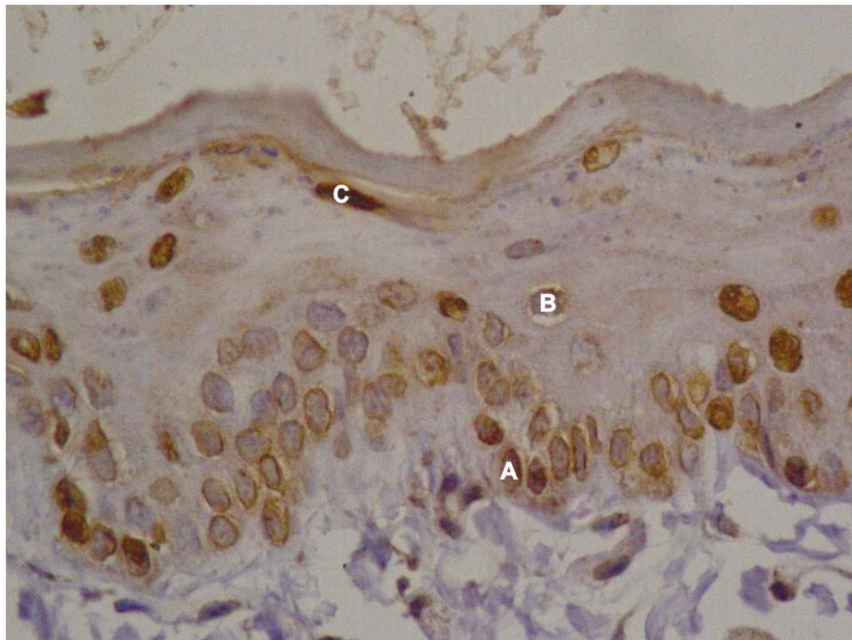


Figura 2: Fotomicrografia do epitélio lingual de camundongo.

Espécime submetido a técnica de TUNEL. [A = Célula da camada basal;
B = Célula da camada suprabasal; C = Célula da camada superficial]
(microscopia de luz; aumento \cong 400X)

Para a análise microscópica, foi realizada calibragem intra-examinador, a fim de se estabelecer um critério de contagem padrão. Esta calibragem foi realizada no período pré-experimental onde, de forma randomizada, foram obtidos 10 campos microscópicos para a quantificação. Após duas semanas, utilizando-se os mesmos campos e método, foi realizada uma segunda quantificação. Em ambos os períodos, o examinador esteve cego em relação ao grupo ao qual pertenciam os campos microscópicos. A forma para quantificar o grau de concordância das mensurações foi realizada através do teste “t” pareado, obtendo-se forte correlação entre as duas contagens (Anexo C). A contagem definitiva foi realizada por um único examinador com cegamento e, a fim de manter a reprodutibilidade durante o estudo, a cada nove campos quantificados, o primeiro foi recontado. Observou-se que não houve diferença significativa entre as duas contagens para o teste “t”pareado (Anexo D). Para a apoptose, não houve diferença; portanto, não houve necessidade da realização do teste.

As lâminas foram posicionadas com a parte fosca à direita do observador e o rastreamento realizado da esquerda para a direita ou da porção superior para a inferior, conforme a posição dos cortes na lâmina. A contagem deu-se em campos contíguos do epitélio, iniciando sempre numa das extremidades. Como critérios de exclusão, foram desconsideradas, para quantificação, áreas que apresentavam cortes transversais das papilas epiteliais e células sobrepostas.

A análise microscópica das células em apoptose, evidenciadas pela técnica de TUNEL, foi realizada obedecendo aos seguintes critérios estabelecidos:

- o tipo de célula detectada positivamente pelo método deve apresentar-se com uma coloração marrom típica da reação de TUNEL, com marcação intensa (coloração

acentuada), homogênea e com forma arredondada ou ovalada, Gavrieli; Sherman; Ben-Sasson (1992) (Figura 3);

- associação da marcação positiva com as características morfológicas próprias da célula em apoptose, como compactação celular e formação de corpúsculos apoptóticos;
- exclusão de células com morfologia de necrose que podem, em alguns casos, conter concentrações de cadeias terminais de DNA coráveis.

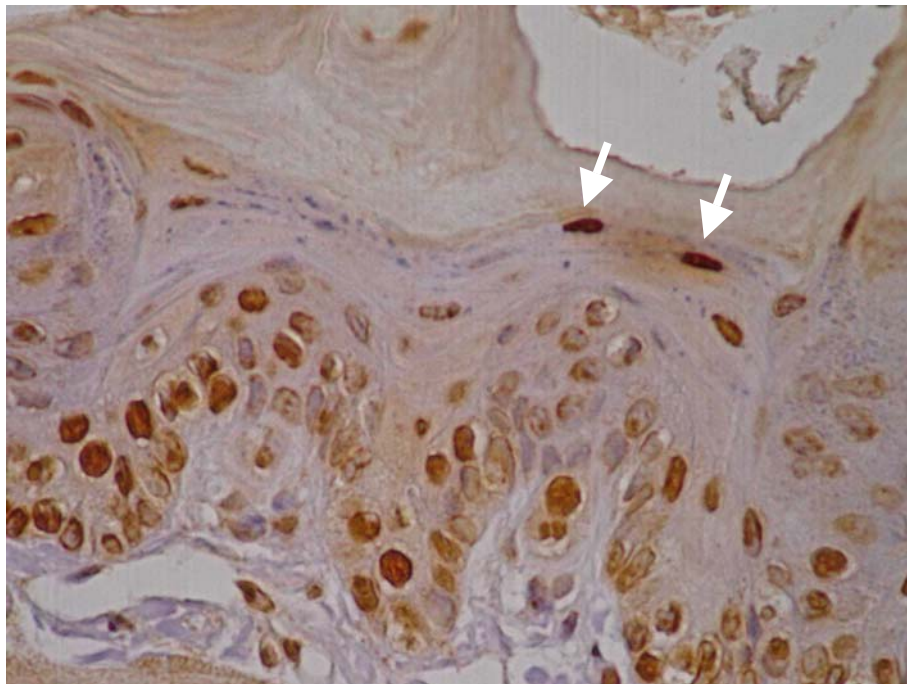


Figura 3: Fotomicrografia do epitélio lingual de camundongo do Grupo Álcool Contínuo no tempo de 12 meses. Espécime submetido a técnica de TUNEL. Observa-se na camada superficial do epitélio, células em apoptose (setas).
(microscopia de luz; aumento \cong 400X)

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para fins de análise estatística, foram utilizados testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, para as variáveis independentes e testes de Friedman, para as variáveis dependentes.

4 RESULTADOS

4.1 COMPARAÇÃO ENTRE OS TEMPOS

4.1.1 Comparação entre os Tempos para o Grupo Controle

Tabela 1 - Comparação entre os tempos na camada basal

Biópsia	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Biópsia inicial	0,10	0,316227766	16,0	0,5958
Biópsia 6 meses	0,00	0	14,5	
Biópsia 12 meses	0,10	0,316227766	16,0	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os tempos estudados na camada basal.

Tabela 2 - Comparação entre os tempos na camada suprabasal

Biópsia	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Biópsia inicial	0,10	0,316227766	15,0	0,7567
Biópsia 6 meses	0,10	0,316227766	15,0	
Biópsia 12 meses	0,20	0,421637021	16,5	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os tempos estudados na camada suprabasal.

Tabela 3 - Comparação entre os tempos na camada superficial

Biópsia	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Biópsia inicial	3,30	1,567021236	12,5	0,2901
Biópsia 6 meses	4,40	2,458545189	15,4	
Biópsia 12 meses	5,80	3,39280284	18,6	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os tempos estudados na camada superficial.

4.1.2 Comparação entre os Tempos para o Grupo Álcool Tópico

Tabela 4 - Comparação entre os tempos na camada basal

Biópsia	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Biópsia inicial	0,00	0	15,5	1,00
Biópsia 6 meses	0,00	0	15,5	
Biópsia 12 meses	0,00	0	15,5	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os tempos estudados na camada basal.

Tabela 5 - Comparação entre os tempos na camada suprabasal

Biópsia	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Biópsia inicial	0,00	0	14,0	0,3177
Biópsia 6 meses	0,10	0,316227766	15,4	
Biópsia 12 meses	0,80	1,751190072	17,1	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os tempos estudados na camada suprabasal.

Tabela 6 - Comparação entre os tempos na camada superficial

Biópsia	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Biópsia inicial	5,60	3,204163958	16,45	0,0756
Biópsia 6 meses	3,80	1,032795559	10,7	
Biópsia 12 meses	6,30	2,584139659	19,35	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os tempos estudados na camada superficial.

4.1.3 Comparação entre os Tempos para Grupo Álcool Contínuo

Tabela 7 - Comparação entre os tempos na camada basal

Biópsia	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Biópsia inicial	0,00	0	15,5	1,00
Biópsia 6 meses	0,00	0	15,5	
Biópsia 12 meses	0,00	0	15,5	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os tempos estudados na camada basal.

Tabela 8 - Comparação entre os tempos na camada suprabasal

Biópsia	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Biópsia inicial	0,20	0,421637021	17,0	0,3416
Biópsia 6 meses	0,00	0	14,0	
Biópsia 12 meses	0,10	0,316227766	15,5	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os tempos estudados na camada suprabasal.

Tabela 9 - Comparação entre os tempos na camada superficial

Biópsia	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Biópsia inicial	4,00	1,885618083	9,75 A	0,0364*
Biópsia 6 meses	6,20	1,549193338	17,8 A B	
Biópsia 12 meses	7,30	4,083843506	18,95 B	

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si.

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os tempos estudados na camada superficial.

Realizando as comparações múltiplas para o teste de Kruskal-Wallis, observa-se que o número de células com apoptose na biópsia dos 12 meses foi maior do que na biópsia inicial.

4.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS GRUPOS

4.2.1 Comparação entre os Grupos na Camada Basal

Tabela 10 - Comparação entre os grupos na camada basal, no tempo zero

Grupo	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Controle	0,1	0,3	16,5	0,3679
Tópico	0	0	15,0	
Contínuo	0	0	15,0	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os grupos estudados na camada basal.

Tabela 11 - Comparação entre os grupos na camada basal, no tempo seis

Grupo	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Controle	0	0	15,5	1,0000
Tópico	0	0	15,5	
Contínuo	0	0	15,5	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os grupos estudados na camada basal.

Tabela 12 - Comparação entre os grupos na camada basal, no tempo 12

Grupo	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Controle	0,1	0,3	16,5	0,3679
Tópico	0	0	15,0	
Contínuo	0	0	15,0	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os grupos estudados na camada basal.

4.2.2 Comparação entre os Grupos na Camada Suprabasal

Tabela 13 - Comparação entre os grupos na camada suprabasal, no tempo zero

Grupo	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Controle	0,1	0,3	15,5	0,3416
Tópico	0	0	14,0	
Contínuo	0,2	0,4	17,0	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os grupos estudados na camada suprabasal.

Tabela 14 - Comparação entre os grupos na camada suprabasal, no tempo seis

Grupo	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Controle	0,1	0,3	16,0	0,5958
Tópico	0,1	0,3	16,0	
Contínuo	0	0,0	14,5	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os grupos estudados na camada suprabasal.

Tabela 15 - Comparação entre os grupos na camada suprabasal, no tempo doze

Grupo	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Controle	0,2	0,4	15,8	0,7427
Tópico	0,8	1,661325	16,3	
Contínuo	0,1	0,3	14,4	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os grupos estudados na camada suprabasal.

4.2.3 Comparação entre os Grupos na Camada Superficial

Tabela 16 - Comparação entre os grupos na camada superficial, no tempo zero

Grupo	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Controle	3,3	1,486607	12,35	0,2125
Tópico	5,6	3,039737	19,15	
Contínuo	4,0	1,788854	15,00	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os grupos estudados na camada superficial.

Tabela 17 - Comparação entre os grupos na camada superficial, no tempo seis

Grupo	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Controle	4,4	2,332381	12,60 B	0,0035*
Tópico	3,8	0,979796	11,15 B	
Contínuo	6,2	1,469694	22,75 A	

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si.

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os grupos estudados na camada superficial.

Realizando as comparações múltiplas para o teste de Kruskal-Wallis, observa-se que o número de células com apoptose na biópsia dos 6 meses foi maior no grupo contínuo que nos outros dois grupos.

Tabela 18 - Comparação entre os grupos na camada superficial, no tempo doze

Grupo	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Controle	5,8	3,218695	13,7	0,6542
Tópico	6,3	2,45153	15,5	
Contínuo	7,3	3,874274	17,3	

Pelo resultado do teste de Kruskal-Wallis, observa-se que não houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para os grupos estudados na camada superficial.

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS CAMADAS

4.3.1 Comparação entre as Camadas no Grupo Controle

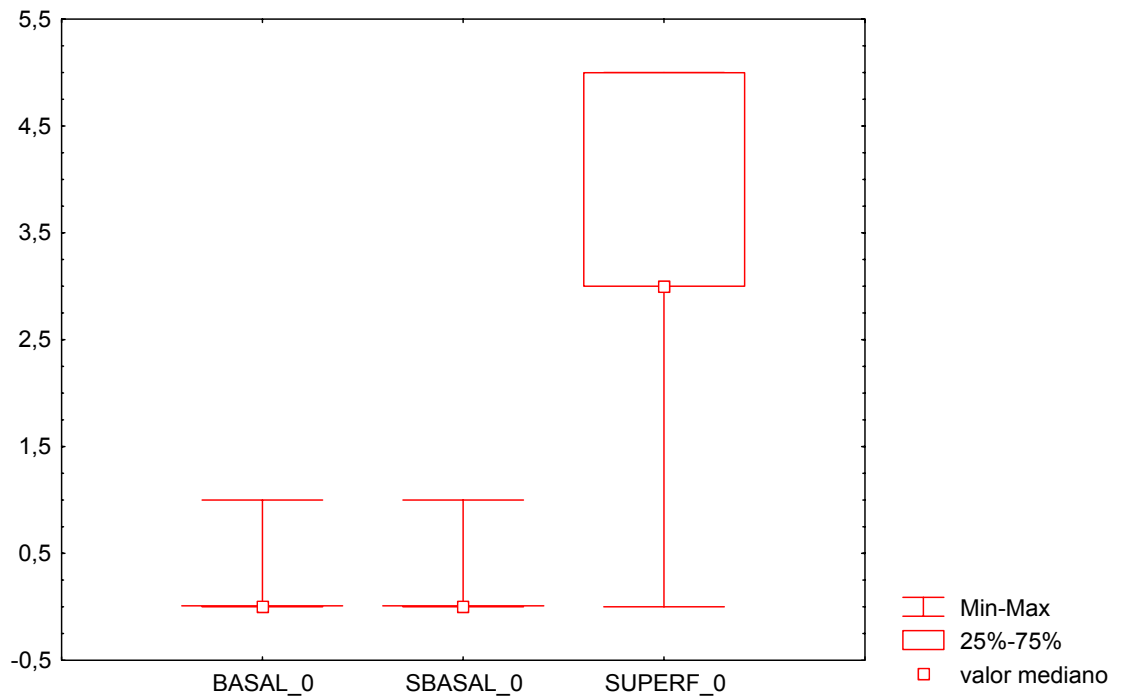
Tabela 19 - Comparação entre as camadas no grupo controle no tempo zero

Camada	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Basal	0,1	0,316228	1,60 A	0,00091*
Suprabasal	0,1	0,316228	1,55 A	
Superficial	3,3	1,567021	2,85 B	

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si.

Pelo resultado do teste de Friedman, observa-se que houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para as camadas estudadas no tempo zero.

Observa-se que a camada superficial difere das camadas basal e suprabasal.

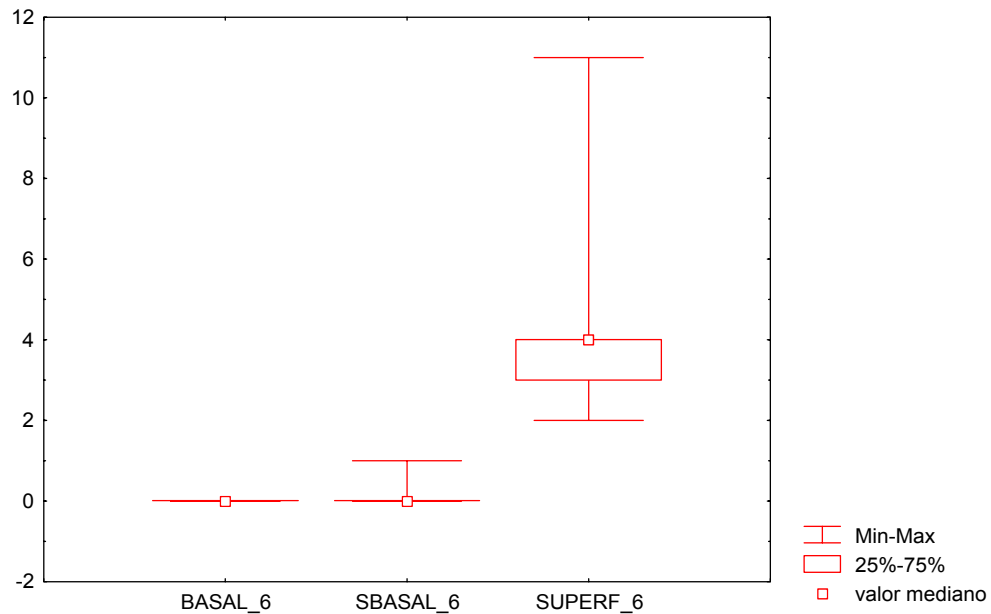
Gráfico 1 - Comparação entre as camadas no grupo controle, no tempo zero**Tabela 20 - Comparação entre as camadas no grupo controle, no tempo seis**

Camada	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Basal	0	0	1,45 A	0,00006*
Suprabasal	0,1	0,316228	1,55 A	
Superficial	4,4	2,458545	3,00 B	

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si.

Pelo resultado do teste de Friedman, observa-se que houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para as camadas estudadas no tempo seis.

Observa-se que a camada superficial diferiu das camadas basal e suprabasal.

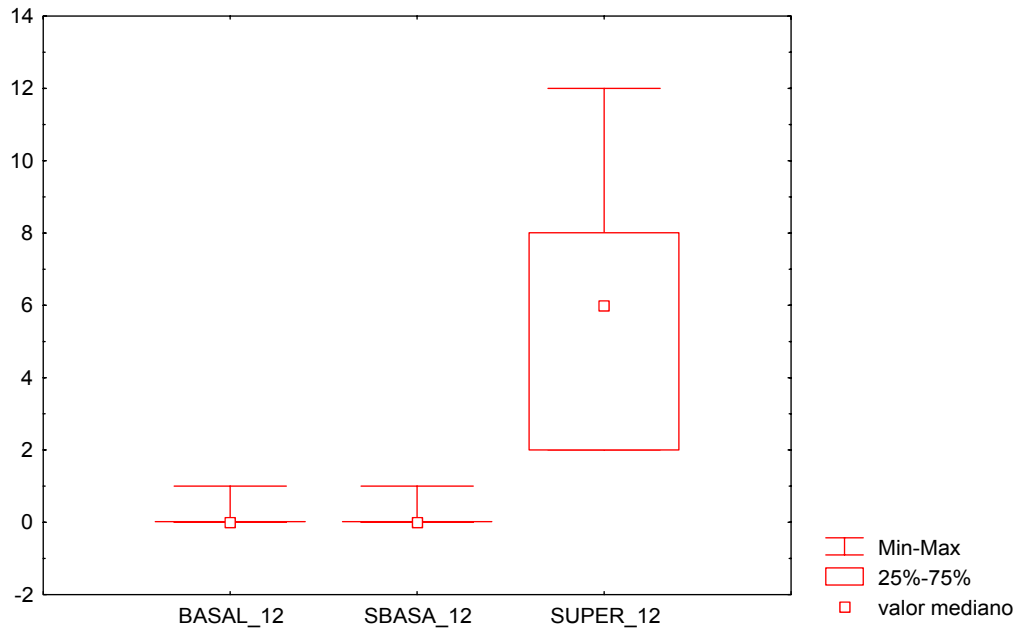
Gráfico 2 - Comparação entre as camadas no grupo controle, no tempo seis**Tabela 21 - Comparação entre as camadas no grupo controle, tempo doze**

Camada	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Basal	0,1	0,316228	1,45 A	0,00011*
Suprabasal	0,2	0,421637	1,55 A	
Superficial	5,8	3,392803	3,00 B	

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si.

Pelo resultado do teste de Friedman, observa-se que houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para as camadas estudadas no tempo doze.

Observa-se que a camada superficial diferiu das camadas basal e suprabasal.

Gráfico 3 - Comparação entre as camadas no grupo controle, no tempo doze

4.3.2 Comparação entre as Camadas no Grupo Álcool Tópico

Tabela 22 - Comparação entre as camadas no grupo álcool tópico, no tempo zero

Camada	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Basal	0	0	1,5 A	0,00005*
Suprabasal	0	0	1,5 A	
Superficial	5,6	3,204164	3,0 B	

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si.

Pelo resultado do teste de Friedman, observa-se que houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para as camadas estudadas no tempo zero.

Observa-se que a camada superficial diferiu das camadas basal e suprabasal.

Gráfico 4 - Comparação entre as camadas no grupo álcool tópico, no tempo zero

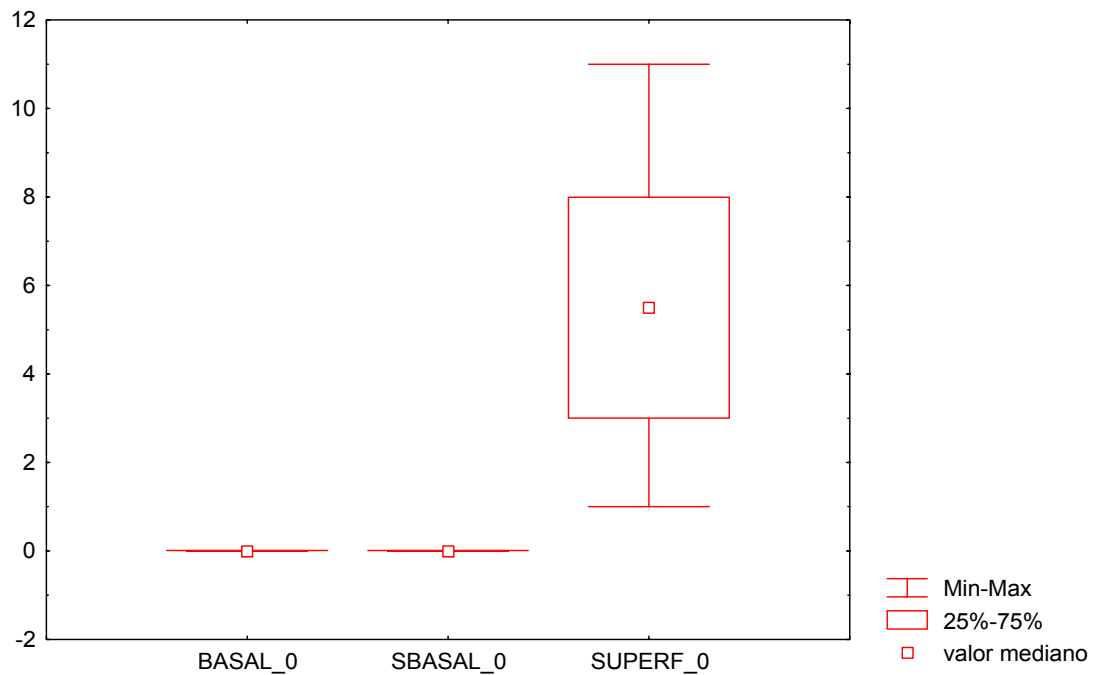


Tabela 23 - Comparação entre as camadas no grupo álcool tópico, no tempo seis

Camada	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Basal	0	0	1,45 A	0,00006*
Suprabasal	0,1	0,316228	1,55 A	
Superficial	3,8	1,032796	3,00 B	

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si.

Pelo resultado do teste de Friedman, observa-se que houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para as camadas estudadas no tempo seis.

Observa-se que a camada superficial diferiu das camadas basal e suprabasal.

Gráfico 5 - Comparação entre as camadas no grupo álcool tópico, no tempo seis

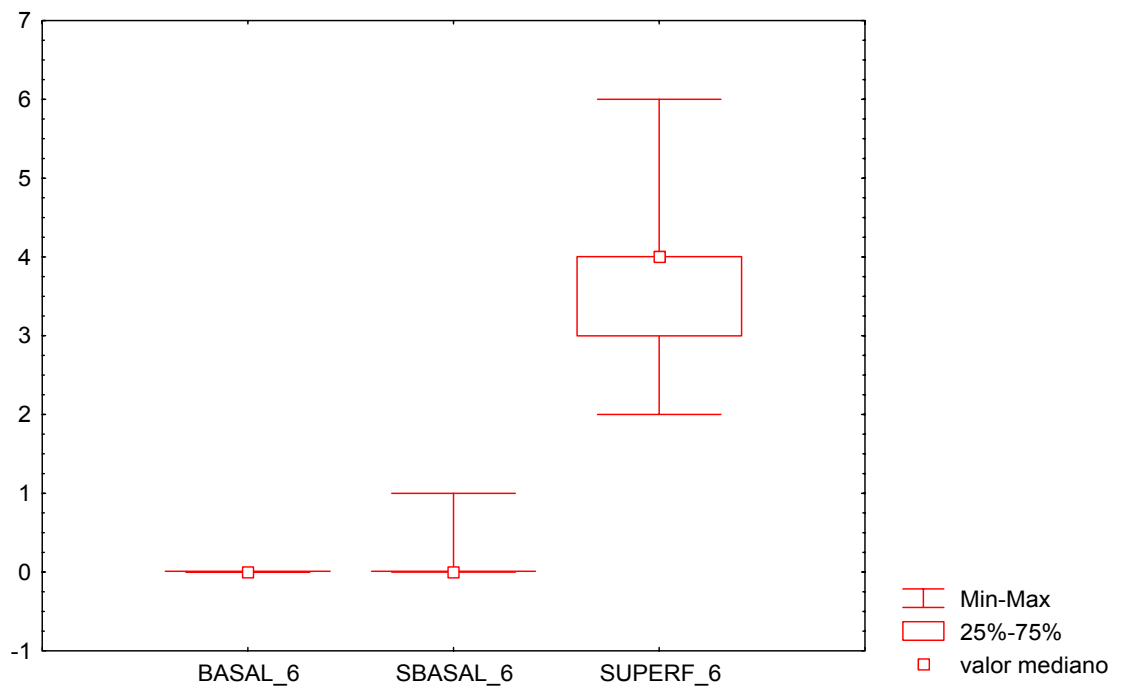


Tabela 24 - Comparação entre as camadas no grupo álcool tópico, no tempo doze

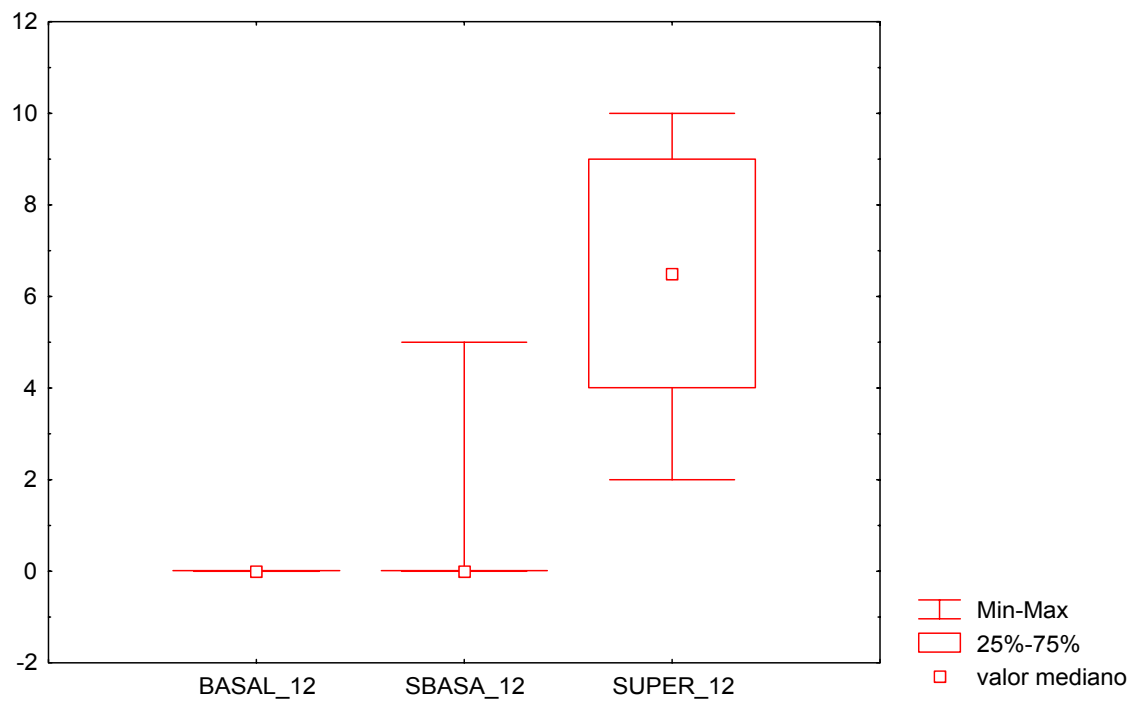
Camada	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Basal	0	0	1,4 A	0,00151*
Suprabasal	0,8	1,75119	1,8 A B	
Superficial	6,300001	2,58414	2,8 B	

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si.

Pelo resultado do teste de Friedman, observa-se que houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para as camadas estudadas no tempo doze.

Observa-se que a camada superficial diferiu da camada basal.

Gráfico 6 - Comparação entre as camadas no grupo álcool tóxico, no tempo doze



4.3.3 Comparação entre as Camadas no Grupo Álcool Contínuo

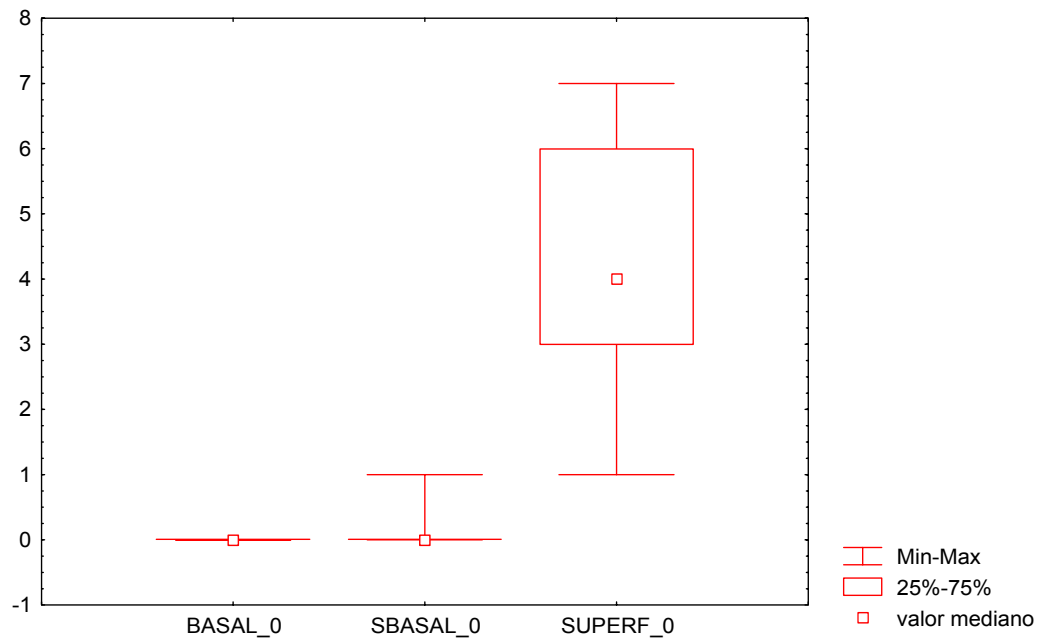
Tabela 25 - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo, no tempo zero

Camada	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Basal	0	0	1,4 A	0,00008*
Suprabasal	0,2	0,421637	1,6 A	
Superficial	4	1,885618	3,0 B	

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si.

Pelo resultado do teste de Friedman, observa-se que houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para as camadas estudadas no tempo zero.

Observa-se que a camada superficial diferiu das camadas basal e suprabasal.

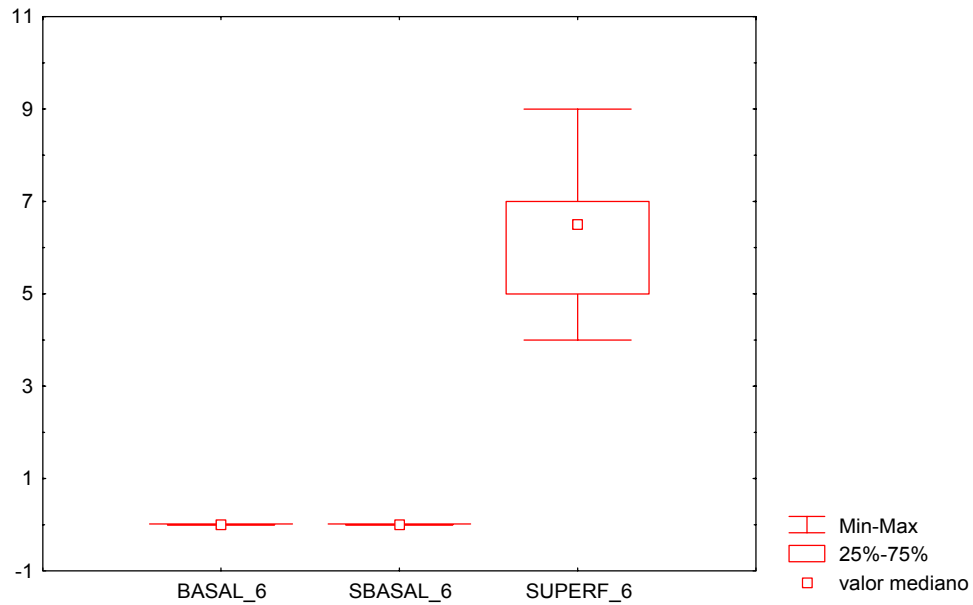
Gráfico 7 - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo, no tempo zero**Tabela 26 - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo, no tempo seis**

Camada	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Basal	0	0	1,5 A	0,00005*
Suprabasal	0	0	1,5 A	
Superficial	6,2	1,549193	3,0 B	

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si.

Pelo resultado do teste de Friedman, observa-se que houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para as camadas estudadas no tempo seis.

Observa-se que a camada superficial diferiu das camadas basal e suprabasal.

Gráfico 8 - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo, no tempo seis**Tabela 27 - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo, no tempo doze**

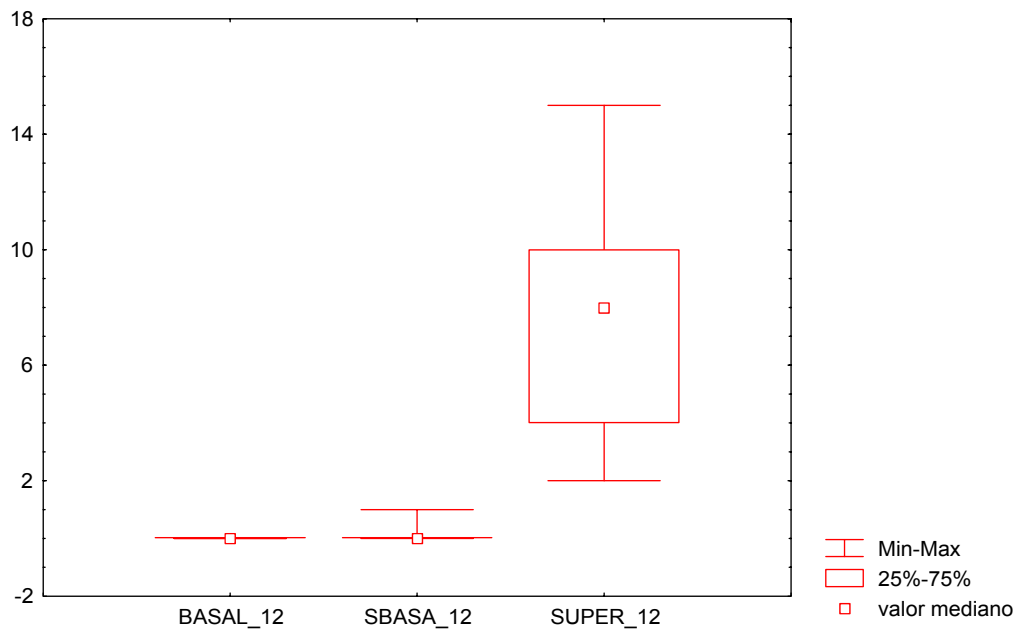
Camada	Média	Desvio Padrão	Rank Médio	P
Basal	0	0	1,45 A	0,00006
Suprabasal	0,1	0,316228	1,55 A	
Superficial	7,3	4,083844	3,00 B	

* Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si.

Pelo resultado do teste de Friedman, observa-se que houve diferença significativa entre o número de células com apoptose para as camadas estudadas no tempo doze.

Observa-se que a camada superficial diferiu das camadas basal e suprabasal.

Gráfico 9 - Comparação entre as camadas no grupo álcool contínuo, no tempo doze



5 DISCUSSÃO

Foi comparado, nos tempos inicial, nos seis e nos doze meses do experimento, o número total de células TUNEL positivas, relacionando-se os dados dentro dos próprios grupos e nos grupos entre si, através do tempo, bem como as camadas nos diferentes grupos e tempos.

Dentre as análises realizadas, duas apresentaram diferenças significativas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e três apresentaram diferenças significativas através do teste não paramétrico de Friedman. As demais comparações não apresentaram diferenças significativas.

O primeiro resultado observado com diferença estatística significativa foi o aumento de células TUNEL positivas na camada superficial do GAC, na análise feita aos doze meses do experimento (Tabela 9).

Maier et al. (1994), Wight; Ogden (1998) e Du et al. (2000), descreveram que o álcool pode causar diminuição da espessura do epitélio através do contato direto com a membrana da célula. Segundo McCoy; Wynder (1979) e Squier; Cox; Hall (1986), o etanol exerce um efeito na bicamada fosfolipídica da membrana celular, removendo algum conteúdo lipídico, o que torna a mucosa consideravelmente mais permeável.

Associada a isso, a alteração do metabolismo de lipídio que ocorre no fígado também resulta em diminuição da barreira de permeabilidade do epitélio bucal, Squier; Kremer; Wertz (1995).

Para Squier; Cox; Hall (1986) e Du et al. (2000), este aumento da permeabilidade é responsável pela diminuição da espessura do epitélio.

Com nossos resultados, sugerimos que a diminuição da espessura do epitélio frente à ação do álcool, deve-se também, ao maior índice de apoptose decorrente de um dano celular não reparado, uma vez que, segundo Ogden; Wight (1998), o consumo crônico de álcool pode ter efeito no mecanismo de reparo de DNA. Dessa forma, a célula segue o caminho da apoptose durante o ciclo celular.

Ao interpretarmos este aumento de células TUNEL positivas na camada superficial do GAC como um aumento na descamação do epitélio, nossos achados concordam com Larentis et al. (2000), que concluíram que o álcool, através do seu uso crônico, causa aumento na descamação do epitélio lingual.

Nossos resultados apóiam Maier et al. (1994), Oliveira et al. (1994) e Sanfelice (2001), que concluíram que, em grupos expostos ao consumo contínuo de álcool, há uma atrofia no epitélio da língua, representada pela redução na espessura do epitélio, fato corroborado pelo aumento da descamação do epitélio lingual, conforme visto por Larentis et al. (2000).

Nos grupos controle e aos submetidos às aplicações tópicas de álcool, não foram observadas diferenças significativas entre o número de células TUNEL positivas, nos diferentes tempos e camadas. Isso sugere que a exposição contínua ao etanol é capaz de alterar quantitativamente a apoptose.

Desde que o termo apoptose foi sugerido por Kerr; Wyllie e Currie, em 1972, para designar a morte celular, caracterizada pelos aspectos morfológicos estereotipados, uma gama imensa de termos tem sido utilizada para referir-se a este tipo de morte, observada tanto em condições fisiológicas como em condições patológicas.

Alguns autores denominam apoptose como morte celular geneticamente determinada, Majno; Joris (1995), morte celular induzida, Hockenbery (1995), morte celular programada, morte celular normal ou suicídio celular, Alberts (1997); outros, como morte celular fisiológica, morte celular patológica, Delfino et al. (1997), morte celular organizada, Rocha (1999) e morte associada a caspase, Thornberry; Lazebnik (1998).

Este fato tem causado dificuldades àqueles que se propõem a estudar a respeito desse assunto, uma vez que muitos autores não elucidam em que condições ocorrem as mortes.

Nossos resultados nos permitem sugerir que o termo morte celular programada seja empregado quando a morte celular ocorrer em situações fisiológicas, tanto durante a embriogênese como durante a homeostase de diferentes órgãos e tecidos e apoptose se o mesmo programa genético de morte celular for induzido ou antecipado por ação de estímulos externos.

O segundo resultado, observado com significância, foi o aumento de células TUNEL positivas na camada superficial no GAC, quando comparadas com os demais grupos. Este fato, porém, foi evidenciado somente aos seis meses do experimento (Tabela 18).

Nossos achados estão de acordo com Slomiany et al. (1998) que, ao investigarem apoptose em células da mucosa bucal de ratos, mantidos por 23 dias em contato com álcool e com uma dieta de líquido controle, observaram uma intensificação da fragmentação do DNA nas células da mucosa bucal no grupo da dieta com álcool e com Katz et al. (2001) que, ao mensurarem a apoptose através da técnica de TUNEL em cultura de hepatócitos humanos, tratados com etanol por 24 horas e com 2 doses consecutivas por 24 horas, cada, observaram, no primeiro grupo, um índice de 22% de apoptose, enquanto que no segundo, o índice de apoptose foi de 36%.

Estes estudos confirmam que, ao longo do tempo, o álcool contínuo aumenta o número de células TUNEL positivas, porém estes resultados nos fazem acreditar que não há necessidade de experimentos de longo prazo para analisarmos o efeito do álcool sobre a apoptose. Na literatura revisada, não foram encontrados estudos de longo prazo.

Aos doze meses do experimento, conforme Tabela 18, os três grupos apresentaram aumento do número de células TUNEL positivas, quando comparados ao período anterior (seis meses). Segundo Ayala et al. (1995), as células de idosos são mais suscetíveis à apoptose, o que foi confirmado em nossos achados; porém, no GAC, este aumento guardou uma proporção menor do que o observado nos demais grupos, tornando não significativa esta diferença. Baseados no número de apoptose, sugerimos que a ação contínua do álcool leva a um comportamento epitelial similar ao observado no epitélio senil uma vez que aos seis

meses, o número de células TUNEL positivas, nesse grupo, apresentou um aumento significativo quando comparado aos demais grupos, fato este não evidenciado aos 12 meses do experimento.

Em relação à mesma comparação, realizada no período inicial, observamos, conforme Tabela 16, que não houve diferença significativa entre as células TUNEL positivas nos diferentes grupos estudados, o que confirma a confiabilidade e precisão da técnica, bem como o fato de que, no início do experimento, os três grupos estavam realmente randomizados.

Ao analisarmos as camadas nos diferentes grupos e tempos, observamos que, nos três grupos (GC, GAT e GAC), houve um aumento de células TUNEL positivas na camada superficial, quando comparadas com as camadas basal e suprabasal.

Delfino et al. (1997), Slomiany et al. (1998) e Colantoni et al. (2003) relataram que uma variedade de estímulos lesivos, quando em baixas doses, são capazes de induzir apoptose no tecido epitelial.

Não encontramos, entretanto, na literatura consultada, qualquer referência quanto à relação entre o índice de apoptose nas diferentes camadas epiteliais.

Os epitélios estratificados queratinizados são formados por células que apresentam diferenças morfológicas e funcionais nos seus diversos estratos, o que indica sua contínua diferenciação à medida que a célula aproxima-se da superfície do epitélio.

Segundo Hadler; Silveira (1993), a referida diferenciação repercute fortemente sobre a forma e a atividade funcional da célula. As células epiteliais menos diferenciadas são metabolicamente ativas, enquanto as mais diferenciadas são quase inertes.

À medida que, nas camadas basal e suprabasal, estão ativados mecanismos pró-mitose e diferenciação, é de se esperar que os mesmos superem eventuais mecanismos de apoptose, tornando-a desta forma, mais evidente na camada superficial, o que nossos resultados confirmam, mostrando que a técnica utilizada foi confiável e correta. Além disso, os critérios usados e a calibragem realizada atestam a reprodutibilidade e confiabilidade deste estudo.

CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada, com a literatura consultada e com base na análise dos resultados obtidos e discutidos, é possível concluir que; em epitélio lingual de camundongos:

1. O álcool contínuo aumenta o número de células em apoptose na camada superficial do epitélio ao longo do tempo, sendo um dos fatores que explicam a redução da espessura desse tecido.
2. A ação eventual do álcool, considerando o número de apoptose, comporta-se similar ao processo fisiológico de envelhecimento do tecido epitelial, entretanto a ação contínua faz com que este tecido adquira mais precocemente este comportamento.
3. O aumento do número de células em apoptose dá-se na camada superficial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AYALA, A.R. et al. El proceso del envejecimiento / Symposium the aging process: I. Hormones and the process of apoptosis. **Gac. Méd. Méx.**, v. 131, no. 2, p. 157-172, mar./abr. 1995.

BORN, I.A. et al. Effects of Chronic Alcohol Drinking on Mouth Mucosa. A morphometric Study. **Laryngorhinootologie**, v. 75, no. 12, p. 758, Dec. 1996.

COLANTONI, A. et al. Hepatic Apoptosis and Proliferation in Male and Female Rats Fed Alcohol Role of Cytokines. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 27, no. 7, p. 1184-1189, Jul. 2003.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 213-268.

DELFINO, A.B.M. et al. O envolvimento de Genes e Proteínas na Regulação da Apoptose-Carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 43, n. 3, jul./ago./set. 1997.

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

FREUND, G. Possible Relationships of Alcohol in Membranes to Cancer. **Cancer Res.**, Denville, v. 39, no. 7, p. 2899-2901, Jul. 1979.

GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y., BEN-SASSON, S. A. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. **J. Cell. Biol.**, v. 119, no. 3, p. 493-501, Nov. 1992.

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

GRAHAM, G.J.; RENNIE, J.S. Biochemical abnormalities of rat lingual epithelium following chronic alcohol intake. **Archs. Oral Biol**, v. 32, no. 1, p. 1-3, 1987.

HADLER, W.A.; SILVEIRA, S.R. **Histofisiologia dos Epitélios: Correlação Entre a Morfologia e a Função nos Epitélios**. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 1993. p. 240-242.

HOCKENBERY, D. Defining Apoptosis. **Am. J. Pathol.**, v. 146, no. 1, p. 16-19, Jan. 1995.

HORTA, M.F.; YOUNG, J.D. Apoptose: quando a célula programa a própria morte. **Ciência Hoje**, v. 25, n. 150, jun. 1999.

HOWIE, N.M.; CRUCHLEY, A.T.; WILLIAMS, D.M. The effect of ethanol on the permeability of oral human mucosa to albumin and sucrose. **J. Dent. Res.**, v. 34, no. 3, 1995.

HOWIE, N.M. et al. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. **Oral Dis**. v. 7, no. 6, p. 349-354, Nov. 2001.

IWANAGA, T. et al. Lamina Propria macrophages involved in cell death (apoptosis) of enterocytes in the small intestine of rats. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 57, no. 3, p. 267-276, Aug. 1994.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 171-197.

KASAGI, N. Ethanol induces Apoptosis in Human Gastric Carcinoma Cell: The Role of Apoptosis – related molecules. **Yonago Acta Medica**, v. 42, no. 1, 1999.

KATZ, G.G. et al. Signaling For Ethanol - Induced Apoptosis and Repair in Vitro. **Clin. Biochem.**, v. 34, no. 3, p. 219-227, May. 2001.

KERR, J.F.; SEARLE, J. The Digestion of Cellular Fragments Within Phagolysosomes in Carcinoma Cells. **J. Pathol.**, v. 108, no. 1, p. 55-58, Sep. 1972.

KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide Ranging Implications in Tissue Kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, no. 4, p. 239-57, Aug. 1972.

KOCH, H. Cancer and the Environment. **Int. Dent. J.**, v. 27, no. 2, p.154-164, Jun. 1977.

KOVACS, E.J.; MESSINGHAM, K.A. Influence of Alcohol and Gender on Immune Response. **Alcohol Res. Health**, v. 26, no. 4, p. 257-263, 2002.

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

LICHTENFELS, P.; BARRIOS, C.H.; MOREIRA, L.F. Apoptose: Morte Celular Programada, **Acta Médica**, v. 20, n. 1, p. 298-311, 1999.

LOURENÇO, S.Q.C.; MELO, N.S.; CONSOLARO, A. Apoptose: Por Que o Tema Mais Atual na Pesquisa de Ponta em Biologia. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 45, n. 6, p. 354-356, 1997.

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

MAIER, H.; WEIDAUER, H. Alcohol Drinking and Tobacco Smoking are the Chief Risk Factors for ENT Tumors. Increased Incidence of Mouth Cavity, Pharyngeal and Laryngeal Carcinomas. **Fortschr Med.**, v. 113, no. 11, p. 157-160, Apr. 1995.

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

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, Oncosis, and Necrosis: An Overview of Cell Death. **Am. J. Pathol.**, v. 146, no. 1, p. 3-15, Jan. 1995.

MASS, P. et al. Premature Keratinocyte Death and Expression of Marker Proteins of Apoptosis in Human Skin After UVB Exposure. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 17, no. 2, p. 71-79, May. 2003.

McCOY, G.D.; WYNDER, E.L. Etiological and Preventive Implication in Alcohol Carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 39, no. 7, p. 2844 -2850, Jul. 1979.

MERIMSKY, O.; INBAR, M. Alcohol Intake-Associated Skin and Mucosal Cancer. **Clin. Dermatol.**, v. 17, no. 4, p. 447-455, Jul./Aug. 1999.

MISHIMA, K.; NARIAI, Y.; YOSHIMURA, Y. Carboplatin Induces fas (APO-1/CD95) – Dependency Apoptosis of Human Tongue Carcinoma Cells: Sensitization for Apoptosis by Upregulation of FADD Expression, **Int. J. Cancer**, v. 105, no. 5, p. 593-600, Jul. 2003.

MINCIS, M.; PEREIRA, A.A.; FERRARI, M.L.L. Ação do Álcool sobre o Aparelho Digestivo. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo**, v.37, n.1, p.30-42, fev. 1982.

MJOR, I.A.; FEJERSKOV, O. **Embriologia e Histologia Oral Humana**. São Paulo: Panamericana, 1990. p. 203-242.

NAKAHARA, T. et al. The Acute and Chronic of Alcohol Exposure on Skeletal Muscle c-myc, p53 and bcl-2 mRNA Expression and the Modulating Influences of Gender, Raised Endogenous Acetaldehyde and Starvation. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 22, Jul. 2003.

OGDEN, G.R.; WIGHT, A.J. Aetiology of Oral Cancer: Alcohol. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 36, no. 4, p.247-251, Aug. 1998.

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

PALMER, D.E. Alcohol Consumption and Cellular Immunocompetence. **Laryngoscope**, v. 88, no. 1, p. 13-17, Jan. 1978.

ROCHA, E. Da Apoptose e Biologia Celular ao Xenotransplante e Zoonoses: Alguns Desafios para o Transplante de Órgãos no Início do Século. **Revista Virtual de Medicina**, v. 1, n. 5, jan./fev./mar. 1999.

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

SEGRETO, H.R. et al. Apoptose e Radiação – Revisão. **Radiol. Bras.**, v. 31, p. 1-8, 1998.

SEIXAS, F.A. Alcohol, a carcinogen? **Câncer J. Clin.** , v. 25, no. 2, p. 62-65, Mar./Apr. 1975.

SIMANOWSKI, U. A. et al. Effect of Alcohol on Gastrointestinal Cell Regeneration as a Possible Mechanism in Alcohol : Associated Carcinogenesis. **Alcohol**, v. 12, no. 2, p. 111-115, Mar./Apr. 1995.

SLOMIANY B.L. et al. Induction of Buccal Mucosal Apoptosis with Chronic Alcohol Ingestion. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 44, no. 2, p. 381-389, Feb. 1998.

SLOMIANY, B.L.; PIOTROWSKI, J.; SLOMIANY, A. Suppression of Endothelin-Converting Enzyme-1 During Buccal Mucosal Ulcer Healing: Effect of Chronic Alcohol Ingestion. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 271, no. 2, p. 318-322, May. 2000.

SQUIER, C.A.; COX, P.; HALL, B.K. Enhanced Penetration of Nitrosornicotine Across Oral Mucosa in the Presence of Ethanol. **J. Oral Pathol.**, v. 15, no. 5, p. 276-279, May. 1986.

SQUIER, C.A.; KREMER, M.; WERTZ, P.W. Ingestion of Alcohol Increases Epithelial Permeability in the Rat. **J. Dent. Res.**, v. 74 (Special Issue), p. 476, 1995.

STELLER, H.; GREYER, M.E. Programmed Cell Death in Drosophila. **Neuron.**, v.13, no. 6, p. 1269-1274, Dec. 1994.

TETU, E.; GREIN, N.J.; CAMPPELLI, R.B. Prophylaxis of Oral Cancer. Specific Protection. **Ars. Curandi. Odont.**, v. 3, no. 5, p. 35-45, Jan./Fev. 1977.

THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies Within. **Science**, v. 281, no. 5381, p. 1312-1316, Aug. 1998.

TRUMAN, J.W.; SCHWARTZ, L.M. Steroid Regulation of Neuronal Death in the Moth Nervous System. **J. Neurosci.**, v. 4, no. 1, p. 274-280, Jan. 1984.

WANG, T.H.; WANG, H.S. Apoptosis: Overview and Clinical Significance. **J. Formos Med. Assoc.**, v. 98, no. 6, p. 381-93, Jun. 1999.

WANG, X.D. Retinoids and Alcohol-related Carcinogenesis. **J. Nutr.**, v. 133, no. 1, p. 287-290, Jan. 2003.

WEISFELNER, M.E.; GOTTLIEB, A.B. The Role of Apoptosis in Human Epidermal Keratinocytes. **J. Drugs. Dermatol.**, v. 2, no. 4, p. 385-391, Aug. 2003.

WIGHT, A.J.; OGDEN, G.R. Possible Mechanisms by Which Alcohol May Influence the Development of Oral Cancer – A Review. **Oral Oncol.**, v. 34, no. 6, p. 441-447, Nov. 1998.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. Cell Death: The Significance of Apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, v. 68, p. 251-356, 1980.

WYLLIE, A.H. Cell Death. **Int. Rev. Cytol.**, v. 17 (suppl), p. 755-785, 1987.

WRIGHT, J.M.; BINNIE, W.H.; WRIGHT, B.A. **Oral Cancer Clinical & Pathological Consideration**. Franklin book Company, 1988. p.240.

ANEXOS

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética

Faculdade de Odontologia da UFRGS

ANEXO B
TÉCNICA DE TUNEL
(TERMINAL DEOXINUCLEOTIDIL TRANSFERASE URACIL
NICK END LABELING)

Inicialmente, os cortes foram aquecidos em câmara úmida a 55° C por 30 minutos; em seguida, foram desparafinizados no xilol em dois tempos de 10 minutos. Na seqüência, as lâminas permaneceram em etanol a 100% por dois tempos de 5 minutos, cada, sendo, posteriormente, lavadas em água destilada. Após este procedimento, foi realizada a recuperação antigênica com a incubação dos cortes em solução de Citrato pH 6,0 em microondas a 5W por 5 minutos, seguida pela lavagem, por dois tempos de cinco minutos, cada, em solução de PBS. A peroxidase endógena foi, então, bloqueada em peridrol e metanol por dois tempos de 15 minutos, cada, seguida de duplo banho em solução de PBS. Após, os cortes foram incubados em solução contendo 50µl de “enzyme solution” e 450µl de “label solution” a 37° C, por 60 minutos, em câmara úmida e lavados três vezes em PBS. A seguir, 3,5 ml da solução “converter-POD” foi aplicada nas lâminas e estas, incubadas em câmara úmida por 30 minutos a 37° C, seguida de mais três lavagens em PBS. Foi, então, aplicado o cromógeno DAB por 1 minuto, com posterior lavagem em água destilada. Os espécimes foram contracorados com hematoxilina, por 30 segundos a temperatura ambiente e novamente lavados em água destilada. O processo foi, então, concluído com a imersão dos cortes em três banhos de álcool 100%, por 1 minuto cada, e duplo banho de xilol, por 10 minutos cada. As lâminas foram, então, montadas em Permount (Fisher ChemAlert®), estando prontas para serem avaliadas.

ANEXO C

CALIBRAGEM INTRA-EXAMINADOR – PRÉ-EXPERIMENTAL

CAMADA BASAL

Teste-t: duas amostras em par para médias

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	20	20
Variância	71.11	71.333333
Observações	10	10
Correlação de Pearson	0.991	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	9	
Stat t	0	
P(T<=t) uni-caudal	0.5	
t crítico uni-caudal	1.833	
P(T<=t) bi-caudal	1	
t crítico bi-caudal	2.262	

CAMADA SUPRABASAL

Teste-t: duas amostras em par para médias

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	29.7	29.1
Variância	171.1222	129.2111
Observações	10	10
Correlação de Pearson	0.990304	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	9	
Stat t	0.786334	
P(T<=t) uni-caudal	0.225939	
t crítico uni-caudal	1.833114	
P(T<=t) bi-caudal	0.451878	
t crítico bi-caudal	2.262159	

ANEXO D

CALIBRAGEM INTRA-EXAMINADOR – DURANTE O EXPERIMENTO

CAMADA BASAL

Teste-t: duas amostras em par para médias

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	29.351648	29.42857
Variância	93.386081	86.4254
Observações	91	91
Correlação de Pearson	0.9884774	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	90	
Stat t	-0.494152	
P(T<=t) uni-caudal	0.3112014	
t crítico uni-caudal	1.6619606	
P(T<=t) bi-caudal	0.6224029	
t crítico bi-caudal	1.9866729	

CAMADA SUPRABASAL

Teste-t: duas amostras em par para médias

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	39.63736	39.73626
Variância	174.7004	150.8852
Observações	91	91
Correlação de Pearson	0.979072	
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	90	
Stat t	-0.34071	
P(T<=t) uni-caudal	0.367058	
t crítico uni-caudal	1.661961	
P(T<=t) bi-caudal	0.734117	
t crítico bi-caudal	1.986673	