

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**RAFAELA NOGUEIRA MOREIRA**

**ALTERAÇÕES EPITELIAIS MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS CAUSADAS  
POR BEBIDAS ALCOÓLICAS DESTILADAS EM LÍNGUA DE *HAMSTERS***

**Diamantina  
2013**

**RAFAELA NOGUEIRA MOREIRA**

**ALTERAÇÕES EPITELIAIS MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS CAUSADAS  
POR BEBIDAS ALCOÓLICAS DESTILADAS EM LÍNGUA DE *HAMSTERS***

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica para obtenção do título de *Magister Scientiae*

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nádia Lages Lima  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Aparecida Marinho

**Diamantina  
2013**

Ficha Técnica

Mestranda Rafaela Nogueira Moreira: fotomicrografias, morfometria, análise estatística, redação  
Dr.<sup>a</sup>. Nádia Lages Lima: concepção original, experimento, análise morfológica e orientação  
Dr.<sup>a</sup>. Sandra Aparecida Marinho: coorientação, revisão geral  
Dr.<sup>a</sup>. Flaviana Dornela Verli: concepção original, revisão geral  
Dhelfeson Willya Douglas de Oliveira: análise estatística  
Sr. Leonardo Monteiro Cunha, técnico: cortes histológicos e coloração

A presente pesquisa foi realizada no Laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde (FCBS) da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM)

Ficha Catalográfica- Sistema de Bibliotecas/ UFVJM  
Bibliotecário Rodrigo Martins Cruz – CRB6-2886.

**M83a  
2013**

Moreira, Rafaela Nogueira  
Alterações epiteliais morfológicas e morfométricas causadas por bebidas alcoólicas destiladas em língua de *hamsters*. / Rafaela Nogueira Moreira - Diamantina: UFVJM, 2013.  
65 P.: il.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Nádia Lages Lima  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Sandra Aparecida Marinho

Dissertação (Mestrado- Odontologia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri / Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde / Departamento de Odontologia.

1. Bebidas alcoólica. 2. Mucosa bucal. 3 Língua.  
I. Lima, Nádia Lages. II. Título.

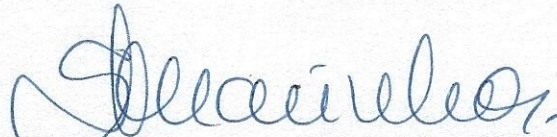
**CDD- 617.2**

RAFAELA NOGUEIRA MOREIRA

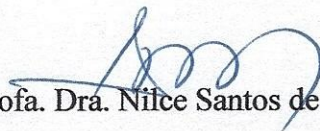
**“ALTERAÇÕES EPITELIAIS MORFOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS CAUSADAS POR BEBIDAS ALCOÓLICAS DESTILADAS EM LÍNGUA DE HAMSTERS”**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

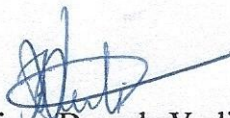
APROVADA EM 28/06/2013



Profª. Dra. Sandra Aparecida Marinho – UEPB  
Co-Orientadora



Profª. Dra. Nilce Santos de Melo - UnB



Profª. Dra. Flaviana Dornela Verli - UFVJM

## DEDICATÓRIA

À minha filha Marina

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sempre estar ao meu lado, guiando meus caminhos.

Ao meu querido, Santo Antônio, por todas as graças recebidas.

À Professora Dra. Nádia Lages Lima, pela orientação, amizade, carinho e respeito. Agradeço por ter aceitado me orientar e pelos valiosos ensinamentos.

À Professora Dra. Sandra Aparecida Marinho, pelos ensinamentos e exemplo de dedicação, disciplina e perseverança.

À Professora Dra. Flaviana Dornela Verli, pelos ensinamentos, dedicação, parceria, paciência e amizade.

À Professora Dra. Nilce Santos de Melo, por ter aceitado o convite de participar da Banca e enriquecer este trabalho.

À Professora Dra. Fernanda de Oliveira Ferreira, pela amizade, parceria, dedicação. Obrigada pelo carinho e por todos os ensinamentos.

Ao Professor Dr. Cássio Roberto Rocha dos Santos, exemplo de dedicação, competência e profissionalismo. Obrigada pelo carinho e por compartilhar suas experiências.

À Professora Dra. Ana Terezinha Marques Mesquita, pela amizade, carinho, e pelos seus ensinamentos desde a graduação.

Ao Professor Dr. Leandro Silva Marques, pela dedicação, apoio e todos os conhecimentos compartilhados na disciplina de oficina de artigos.

Aos Professores do PPGOdonto, pelos os ensinamentos e por contribuírem para o meu crescimento profissional.

À Professora Dra. Maria Letícia Ramos-Jorge, pela coordenação do PPGOdonto, pelo apoio, e por todos os ensinamentos.

Ao amigo, Dhelfeson Willya Douglas de Oliveira, pela parceria, disponibilidade, amizade e por ter contribuído com esse trabalho.

Aos amigos, Anne Batista, Márcio Homem, Isabella Veloso, Rafael Menezes, Vitor Dumond, pelos bons momentos, pela amizade e parceria.

À Gislene Alessandra Santos, secretária do PPGOdonto, pelo carinho, atenção, amizade, competência e pela disponibilidade.

À Adriana Kátia dos Santos, secretária do PRPPG, pela dedicação e ajuda.

Ao Sr Leonardo Monteiro Cunha, por ter contribuído com esse trabalho, pela paciência e dedicação.

À UFVJM, pela concessão da bolsa de mestrado.

À Diamantina, lugar de conquistas e doces lembranças.

Muito Obrigada!

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Aos meus pais, Laura Adelaide Nogueira Moreira e Mário Lúcio Moreira, pelo amor e carinho incondicional. Obrigada por estarem sempre ao meu lado e por me apoiarem em busca de mais esta conquista profissional.

À minha irmã, Cristiane Nogueira Moreira, pela amizade, amor, carinho e pelas palavras de incentivo.

A todos os meus familiares, avós, tios, primos, pelo apoio e carinho.

Ao meu esposo, Mauro Lúcio Gonçalves, pela compreensão, amor, carinho e apoio. E à sua família, pelo carinho.

À minha filha, Marina Moreira Gonçalves, por ter-me apresentado ao sentimento mais nobre, mais intenso e maravilhoso do mundo. Obrigada filha, por me fazer muito feliz!

Muito Obrigada!



*“Para ser grande, sê inteiro: nada Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és No mínimo que fazes. Assim  
em cada lago a lua toda Brilha, porque alta vive.”*

*Fernando Pessoa*

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar se a aplicação tópica de bebidas alcoólicas destiladas, cachaça e uísque, altera a espessura epitelial da mucosa lingual de hamsters. Após cálculo amostral, 720 campos microscópicos foram utilizados para mensuração da espessura total do epitélio de língua (camada epitelial mais camada córnea). Quarenta hamsters foram divididos em dois grupos experimentais, conforme aplicação da substância teste, em grupo 1 (cachaça 48°gl) e grupo 2 (uísque 40°gl), ambos avaliados em períodos experimentais de 13 e 20 semanas. A borda contralateral da língua, que não recebeu a substância teste, foi utilizada como controle. Após eutanásia, as línguas foram dissecadas, fixadas em solução de formol 10% e processadas para a obtenção de cortes histológicos, que foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Para a análise morfométrica, três lâminas por espécime foram avaliadas. A espessura do epitélio, de ambas as bordas da língua, foi mensurada com auxílio do Programa Motic Images Plus 2.0 (Motic<sup>®</sup>). Os dados da análise morfométrica foram avaliados pela estatística descritiva e teste de Wilcoxon e teste de Mann-Whitney. No grupo cachaça, em relação à espessura total do epitélio, houve diferença estatística significativa entre a média do lado teste, 61,87 (14,75) $\mu$ m e a média do lado controle, de 67,20 (9,96) $\mu$ m ( $p=0,044$ ). Também observou-se uma redução altamente significativa da espessura das camadas epitelial ( $p<0,001$ ) e córnea ( $p=0,021$ ). No período de 13 semanas, houve diminuição estatística significativa da espessura das camadas córnea ( $p=0,032$ ) e epitelial ( $p<0,001$ ), enquanto que, em 20 semanas, somente a camada epitelial apresentou-se significativamente reduzida ( $p=0,002$ ). No grupo uísque houve aumento significativo da espessura da camada córnea ( $p=0,015$ ) e epitelial ( $p=0,012$ ) em 13 semanas. Conclui-se que tipos diferentes de bebidas alcoólicas destiladas, com concentração alcoólica entre 40°gl e 48°gl, promoveram alterações morfométricas e morfológicas diferenciadas. A cachaça promoveu atrofia epitelial, o que poderia facilitar a penetração de substâncias ou agentes carcinogênicos. Já o uísque promoveu hiperplasia, podendo assim sugerir o início do desenvolvimento de lesões pré-malignas.

**Palavras-chave:** bebidas alcoólicas, mucosa bucal, língua.

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine whether topical application of distilled spirits, cachaça and whiskey, alter the epithelial thickness of tongue mucosa of hamsters. After sample size calculation, 720 microscopic fields were used to measure the total thickness of the tongue epithelium (epithelial layer over the stratum corneum). Forty hamsters were divided into two groups, depending on the application of the test substance in group 1 (cachaça 48°gl) and group 2 (whiskey 40°gl), both evaluated in the experimental periods of 13 and 20 weeks. The contralateral side of the tongue, which has not received the test substance was used as control. After euthanasia, the tongues were dissected, fixed in 10% formalin solution, processed to obtain histological sections and were stained by hematoxylin and eosin (HE). For the morphometric analysis, three slides per specimen were evaluated. The thickness of the epithelium, both edges of the tongue, was measured with the aid of the program Motic Images Plus 2.0 (Motic ®). Data from morphometric analysis were evaluated by descriptive statistics and by Wilcoxon and Mann-Whitney tests. In cachaça group, regarding the total thickness of the epithelium, there was a statistically significant difference between the average of the test side, 61.87 (14.75)  $\mu\text{m}$  and the average of the control side, 67.20 (9.96)  $\mu\text{m}$  ( $p=0.044$ ). It was also observed a highly significant reduction in the thickness of the epithelium ( $p<0.001$ ) and the cornea ( $p=0.021$ ). At 13 weeks, there was a statistically significant decrease in the thickness of the cornea ( $p=0.032$ ) and epithelial ( $p<0.001$ ), whereas at 20 weeks, only the epithelial layer was significantly reduced ( $p=0.002$ ). In the Whiskey group, there was a significant increase in thickness of the cornea ( $p=0.015$ ) and epithelial ( $p=0.012$ ) at 13 weeks. It was conclude that different types of distilled spirits with alcohol concentration between 40 °gl and 48 °gl, promoted morphological and morphometric changes differentiated. Cachaça promoted epithelial atrophy, which could facilitate the penetration of substances give or carcinogens. The whiskey promoted hyperplasia which suggest the early development of premalignant lesions.

**Keywords:** alcohols, mouth mucosa, tongue.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Material e Métodos

Quadro 1	Distribuição dos grupos experimentais e da quantidade de campos mensurados por grupo.....	21
Quadro 2	Distribuição do número de lâminas histológicas, fotomicrografias, campos microscópicos e mensurações realizadas tanto por espécime quanto por grupo.....	22
Figura 1	Avaliação morfométrica do tecido epitelial com auxílio do Programa Motic Images Plus 2.0.....	23
Quadro 3	Distribuição dos campos morfológicos analisados por espécime e das mensurações realizadas por campo.....	23

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Artigo

Quadro 1	Distribuição do número de lâminas histológicas, fotomicrografias, campos microscópicos e mensurações realizadas tanto por espécime quanto por grupo.....	35
Figura 1	Fotomicrografia do epitélio de língua do grupo cachaça: (A) lado controle (B) lado teste. HE, 200X.....	35
Figura 2	Fotomicrografia do epitélio de língua do grupo uísque: (A) lado controle (B) lado teste. HE, 100X.....	36
Figura 3	Fotomicrografia do epitélio de língua do grupo uísque (lado teste). Presença de hipercromatismo nuclear (estrelas) e hiperplasia basilar (setas). HE, 200X.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espessura total do epitélio (camada córnea mais camada epitelial) para lados teste e controle dos grupos cachaça e uísque.....	34
Tabela 2	Espessura das camadas córnea e epitelial do grupo cachaça.....	34
Tabela 3	Espessura das camadas córnea e epitelial do grupo uísque .....	34
Tabela 4	Espessura das camadas córnea e epitelial de acordo com o tempo de aplicação das substâncias.....	34
Tabela 5	Espessura das camadas córnea e epitelial do lado teste dos grupos cachaça e uísque em 13 e 20 semanas.....	35
Tabela 6	Espessura das camadas córnea e epitelial do lado controle dos grupos cachaça e uísque em 13 e 20 semanas.....	35

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO DE PESQUISA.....</b>	<b>25</b>
	Resumo.....	27
	Introdução.....	28
	Material e Métodos.....	28
	Resultados.....	30
	Discussão.....	31
	Referências.....	37
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>47</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>49</b>
	<b>BIOGRAFIA.....</b>	<b>62</b>



---

*1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS*



## 1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Substâncias contendo álcool são amplamente consumidas no mundo inteiro. Pouco mais de 40% da população adulta do mundo consome álcool e a média de consumo por indivíduo é de 17,1 litros por ano (SHIELD et al., 2013). A ingestão de bebidas alcoólicas está associada à xerostomia, sialodenoze, inflamação da mucosa bucal (SLOMIANY et al., 1998<sub>a</sub>), imunossupressão, aumento da incidência de doenças infecciosas (GORAL et al., 2008; XU et al., 2009) e de câncer (BAGNARDI et al., 2013).

A boca é a primeira estrutura a entrar em contato com o álcool, e a etiologia da alteração das defesas da mucosa bucal ainda deve ser mais elucidada (SLOMIANY et al., 1998<sub>a</sub>; SLOMIANY et al., 1998<sub>c</sub>). Efeitos do álcool têm sido relacionados com alterações na arquitetura da membrana de células epiteliais e na proliferação celular, alterações dos processos responsáveis pela manutenção do meio citosólico e inibição da síntese de proteínas e de ácidos nucléicos (SLOMIANY et al., 1998<sub>a</sub>).

A ingestão crônica de álcool exerce efeitos moleculares e morfológicos diversos tais como: estresse oxidativo decorrentes do seu metabolismo (SZACHOWICZ-PETELSKA et al., 2012); desregulação de citocinas pró-inflamatórias (SLOMIANY et al., 1998<sub>b</sub>); aumento da liberação de endotelina 1 (ET-1); alterações do óxido nítrico (NO) (SLOMIANY et al., 1998<sub>c</sub>); prejuízo à sinalização iniciada pelo receptor do fator de crescimento fibroblástico beta (bFGF-R) (SLOMIANY et al., 1998<sub>d</sub>); diminuição dos níveis de vitamina A nas estruturas bucais (SEITZ et al., 2001) e promoção de atrofia do tecido epitelial (MASCRES et al., 1984; VALENTINE et al., 1985; MAIER et al., 1994).

O estresse oxidativo tem sido relacionado a mudanças na estrutura e função dos componentes celulares, incluindo a membrana fosfolipídica e proteínas (SZACHOWICZ-PETELSKA et al., 2012). Uma vez ingerido, o álcool é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e cerca de 90% é metabolizado pelo fígado, onde é oxidado em acetaldeído e em seguida em acetato. Esses processos são acompanhados pela geração de radicais livres, altamente reativos (VALLET et al., 1997; PONAPPA; RUBIN, 2000). Acetaldeído e espécies reativas de oxigênio (ROS *reactive oxygen species*) podem reagir com aminoácidos, proteínas, peptídeos, modificando suas composições e funções (DOORN; PETERSEN, 2002; GRIMSRUD et al., 2008). Assim, a peroxidação de radicais livres, principalmente de lipídeos insaturados, altera importantes funções estruturais e de proteção das biomembranas. Certamente, muitos eventos patológicos resultam dessa oxidação. Portanto, o abuso do álcool tem sido relacionado a um certo número de mudanças químicas e desordens moleculares em

humanos e animais (WAGNER et al., 1994; SZACHOWICZ-PETELSKA et al., 2012).

Há um aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), em decorrência da ingestão crônica do álcool provocando, assim, eventos apoptóticos (SLOMIANY et al., 1998<sub>c</sub>). Outra consequência, igualmente deletéria na integridade do tecido da mucosa bucal, é o aumento da liberação de endotelina-1 (ET-1), um potente vasoconstritor, e alterações do óxido nítrico (NO) (SLOMIANY et al., 1998<sub>b</sub>). O óxido nítrico (NO) é um mediador importante das defesas das mucosas e uma molécula-chave envolvida nos eventos de sinalização associados a apoptose celular, podendo ser responsável pelo enfraquecimento das defesas da mucosa bucal em alcoólatras. A ativação maciça de uma das suas isoformas, a óxido nítrico sintase (NOS-2), tem efeitos citotóxicos, causando distúrbios transcricionais e indução de proteases caspases pró-apoptóticas (SLOMIANY et al., 1998<sub>b</sub>; SLOMIANY et al., 1998<sub>c</sub>). A ativação de caspases e subsequente proteólise de um conjunto de proteínas celulares específicas, incluindo adenosina difosfato ribose polimerase (ADP), laminina e quinase de adesão focal, é reconhecida como agente responsável pelos eventos bioquímicos da apoptose, esta última caracterizada por retração citoplasmática, ruptura da membrana nuclear, condensação da estrutura de cromatina e fragmentação do DNA (SLOMIANY et al., 1998<sub>b</sub>; 1998<sub>c</sub>).

Efeito prejudicial sobre os eventos de sinalização iniciada por receptor de ligação do fator de crescimento fibroblástico beta (bFGF-R), e sobre a ativação e propagação do receptor de quinases ciclo-dependentes (Cdk2), é observado com a ingestão crônica de álcool. O receptor de quinases ciclo-dependentes (Cdk2) impulsiona a progressão do ciclo celular e é essencial para a reparação de feridas da mucosa (SLOMIANY et al., 1998<sub>d</sub>). Estudo que avaliou a velocidade de cura de ulcerações na mucosa bucal induzida por meio de ácido acético mostrou que animais submetidos à dieta alcoólica apresentaram um retardo no reparo de feridas quando comparado a animais que não receberam dieta alcoólica (SLOMIANY et al., 1998<sub>d</sub>).

A diminuição dos níveis de vitamina A (retinol) nas estruturas bucais, é também observada, uma vez que o álcool é um inibidor competitivo do metabolismo do retinol. Ao mesmo tempo, o acetaldeído também é capaz de inibir o metabolismo da vitamina A, prejudicando a geração de ácido retinóico (SEITZ et al., 2001). Baixos níveis dessa vitamina contribuem para uma falta de controle no crescimento epitelial, o que poderia desencadear alterações epiteliais e consequentemente, iniciar o desenvolvimento de lesões malignas (FIGUERO RUIZ et al., 2004).

O álcool promove na mucosa bucal, alteração morfológica caracterizada por atrofia do

epitélio seguida de hiper-regeneração da camada basal (MASCRES et al., 1984; VALENTINE et al., 1985; MAIER et al., 1994). A redução da espessura do epitélio aumenta a vulnerabilidade frente aos agentes nocivos e químicos, permitindo a penetração de carcinógenos através da mucosa. Isso se dá tanto pelo aumento da solubilidade, quanto da permeabilidade (WIGHT; OGDEN, 1998; HOWIE et al., 2001; SEITZ et al., 2001; BOR-CAYMAZ et al., 2011), devido à ruptura de moléculas lipídicas de sua disposição normal ordenada, abrindo, assim, rotas entre as células (HOWIE et al., 2001; SZACHOWICZ-PETELSKA et al., 2012).

Evidências indicam que o álcool, juntamente com o acetaldeído, são os principais fatores carcinogênicos em bebidas alcoólicas. Outros componentes químicos e contaminantes das bebidas podem adicionalmente contribuir para promoção de alterações morfológicas e para a carcinogenicidade (REHM, 2010), tais como chumbo, nitrato, pesticidas, micotoxinas e carbamato de etila (LACHENMEIER et al., 2010). Essa última substância tem sido julgada como risco adicional para a saúde dos consumidores de álcool, pois se trata de uma substância genotóxica reconhecida e com grande ocorrência em alimentos fermentados e bebidas.

Há várias limitações quando se avaliam os estudos relacionados ao tipo de bebida e o risco de câncer bucal. Primeiro, existem diferenças na terminologia das medições de álcool no mundo e, em segundo lugar, pelo fato de o consumo não ser apenas de uma bebida alcoólica específica, podendo haver diferenças do teor alcoólico entre as diferentes marcas. Em terceiro lugar, pode haver limitações em se mensurar com precisão a quantidade de álcool consumida pelos indivíduos, seja pela relutância ou incapacidade dos indivíduos em fornecer uma exata história do consumo (WIGHT; OGDEN, 1998). Assim, observa-se a importância e a necessidade de estudos experimentais com animais, pois essas variáveis de confusão podem ser controladas, e os aspectos morfológicos teciduais, frente à aplicação tópica dessas bebidas, podem ser observados.

As bebidas alcoólicas diferenciam-se umas das outras, não apenas pela concentração de álcool ou marca, mas também no seu processo de fabricação (fermentação, destilação ou processos de maturação). Estes processos podem contribuir para a presença de impurezas ou contaminantes (ROGERS et al., 1995). Além disso, existem controvérsias sobre o tipo de bebida alcoólica e seu papel na carcinogênese bucal (BLOT et al., 1988; WIGHT; OGDEN, 1998). Dessa forma, ressalta-se a necessidade de mais estudos que avaliam as alterações morfológicas dos tecidos expostos a essas substâncias.

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, BRASIL, 2009), cachaça é a denominação típica e exclusiva da aguardente de cana

produzida no Brasil, com graduação alcoólica de 38% a 48% em volume a 20 graus Celsius, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares, podendo ser adicionada de açúcares até seis gramas por litro, expressos em sacarose. Segundo a instrução normativa 13/2005, que estabelece os padrões de qualidade e composição química da cachaça, a bebida poderá apresentar, em quantidades pré-estabelecidas, componentes como: ácido acético; aldeídos (expressos em acetaldeído); ésteres totais (expressos em acetato de etila); álcoois superiores (expressos pela soma do álcool n-propílico, álcool isobutílico e álcoois isoamílicos); furfural mais hidroximetilfurfural; álcool metílico; álcool sec-butílico; álcool n-butílico; carbamato de etila; acroleína; diacetil; cobre; arsênio; chumbo (BRASIL, 2009).

Uísque refere-se a uma ampla categoria de bebidas alcoólicas destiladas a partir de grãos fermentados e envelhecida em tonéis de madeira, geralmente feitos de carvalho, normalmente por mais de oito anos (YOSHIOKA et al., 2011). A legislação brasileira define uísque como bebida com graduação alcoólica de 38% a 54% em volume, a 20 graus Celsius. Os principais cereais utilizados para a elaboração de uísque são a cevada, milho, trigo ou centeio, permitindo a formulação de tipos diferentes de bebida: uísque de malte (“*malt whisky*”), uísque de grão (“*grain whisky*”) e uísque cortado (“*blended whisky*”) (BRASIL, 2009). Durante o processo de envelhecimento, muitos ingredientes da madeira são exsudados no uísque devido à elevada concentração do álcool, e a subsequente oxidação que ocorre no barril. Outras reações químicas ocorrem no processo e contribuem para dar sabor suave e cor à bebida. Os maiores componentes de congêneres do uísque são o açúcar e o caramelo. O ácido elágico, ácido gálico e lioniresinol são os principais ingredientes fenólicos do uísque e possíveis responsáveis por seus efeitos antioxidantes e despigmentantes (YOSHIOKA et al., 2011).

A exata atuação do álcool na alteração do tecido epitelial ainda é incerta e diferentes bebidas alcoólicas podem estimular respostas epiteliais diferentes (LECLERC et al., 1987; CASTELLSAGUÉ et al., 2004). Embora existam estudos evidenciando alterações morfológicas na mucosa bucal causadas pelo álcool puro (VALENTINE et al., 1985; MAIER et al., 1994; MARTINEZ et al., 2005), poucos avaliaram os efeitos tópicos de bebidas alcoólicas em mucosa (LIMA, 1997; LIMA et al., 1999). A proposta do presente estudo foi verificar se a aplicação tópica de bebidas alcoólicas destiladas, cachaça e o uísque, altera a espessura epitelial da mucosa lingual de *hamsters*.



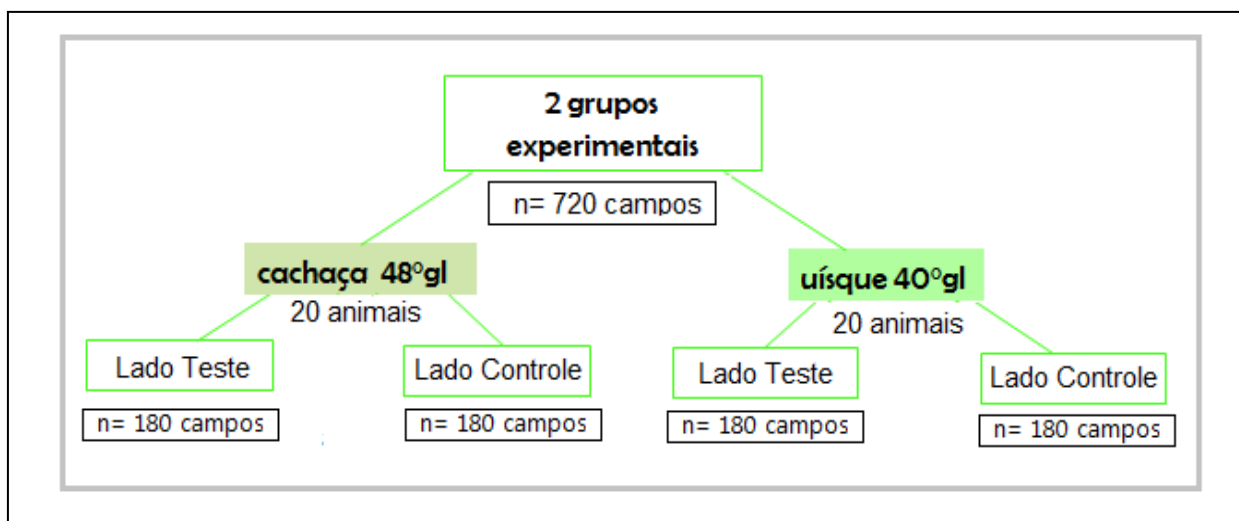
## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### **Delineamento e aspectos éticos**

A presente pesquisa foi caracterizada por um modelo *in vivo*. Os animais, procedentes do Centro de Pesquisa René Rachou (FIOCRUZ Minas, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), foram alimentados com ração balanceada (Nuvilab CR1, Nuvital<sup>®</sup>, Colombo, Paraná, Brasil) e água *ad libitum*. O experimento foi realizado após aprovação (protocolo nº 008/11) da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (CEUA/UFVJM) (Anexo 1).

### **Cálculo amostral e grupos experimentais**

Para o cálculo do tamanho amostral, utilizou-se a fórmula para comparação de médias adotando um nível de significância de 95%, poder estatístico de 80%, desvio-padrão de 3,76 $\mu$ m e uma diferença mínima a ser detectada entre os grupos de 0,8 $\mu$ m (SALUM, et al., 2006). Pelo cálculo amostral, a quantidade de campos morfológicos a serem investigados por lado mensurado em cada grupo (cachaça e uísque) foi de 170, totalizando, no mínimo, 680 campos necessários. Como foram utilizados 40 *hamsters* machos e fêmeas, com idade média de 90 dias, da espécie *Mesocricetus auratus*, pesando em média 158,5g, 720 campos foram mensurados. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais. As substâncias testadas em cada grupo experimental foram cachaça 48°gl (grupo 1) e uísque 40°gl (grupo 2), ambos avaliados em período experimentais de 13 e 20 semanas. As bebidas foram selecionadas dentre uma amostragem de marcas comerciais, sendo utilizados o uísque e a cachaça que no alcoômetro Gay-Lussac, demonstraram maior teor alcoólico. Para ambos os grupos, houve mensuração da espessura epitelial dos lados teste (direito) e controle (esquerdo). A distribuição dos animais, dos grupos e a quantidade dos campos morfológicos mensurados por grupo se encontram no quadro 1.



**Quadro 1:** Distribuição dos grupos experimentais e da quantidade de campos mensurados por grupo

### **Aplicação tópica das substâncias**

A aplicação tópica das substâncias testadas foi realizada por meio de um pincel de pêlo de camelo, número zero (Tigre®, São Paulo, Brasil), na borda lateral direita da mucosa lingual. Cada aplicação consistiu em quatro pinceladas únicas e consecutivas em bordo de língua, de posterior para anterior, retirando-se o excesso das soluções em cada pincelada, para evitar o escorrimento e deglutição pelos animais. As aplicações foram realizadas em dias alternados (segunda, quarta e sexta) por um período máximo de 20 semanas. A borda contralateral da mucosa lingual que não recebeu a substância teste foi utilizada como controle.

### **Eutanásia e processamento histopatológico**

Após 13 e 20 semanas do início do experimento, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de 10mg/Kg de xilazina injetável (Anacedan®, Laboratório Agribrands, SP) associada à 200mg/Kg de quetamina (Dopamim®, Laboratório Agribrands, SP). Uma vez anestesiados, os animais foram decapitados e as suas cabeças imediatamente submersas em solução de formol 10% tamponado, por um período de 48 horas. Após fixadas, a mandíbula e a língua foram separadas da maxila para melhor acesso às estruturas. Em seguida, foi realizada dissecação da língua e sua macroscopia. A língua foi dividida, por corte transversal, em terços apical, médio e posterior. O terço médio foi submetido ao processamento histológico e incluído em parafina para secção. Foram realizados cortes transversais seriados, sendo que cinco cortes foram descartados no intervalo de obtenção de cada lâmina. Assim, obtiveram-se cinco lâminas de cada espécime e destas avaliaram-se as lâminas ímpares, que foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

### **Avaliação morfológica**

A avaliação morfológica descritiva de ambos os sítios anatômicos, mucosa lateral direita (lado teste) e mucosa lateral esquerda (lado controle) da língua foi realizada por um único examinador, devidamente calibrado e cego para os diferentes grupos. Para isso, foi utilizado um microscópio de luz (Opton<sup>®</sup>, Guiyang, China), com aumentos de 100, 200 e 400 vezes. De acordo com o cálculo amostral, para cada espécime, foram avaliadas três lâminas, sendo que, em cada lâmina foram avaliados três campos do lado controle e três do lado teste, totalizando 18 campos por espécime (Quadro 2).

	Lâminas	Fotomicrografias	Campos microscópicos	Mensurações
Por Espécime	3	18	18	108
Por Grupo	60	360	360	2.160
Total	117*	702*	684**	4.104

\* Houve perda por morte de um animal do grupo uisque

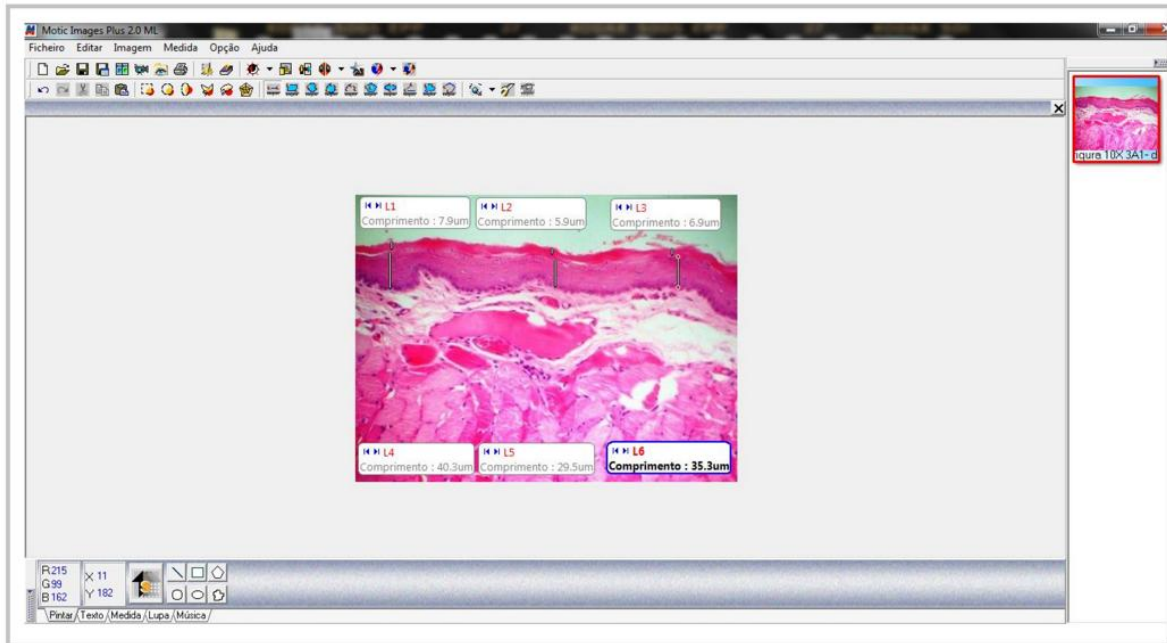
\*\* houve perda de 18 campos em cada grupo

**Quadro 2:** Distribuição do número de lâminas histológicas, fotomicrografias, campos microscópicos e mensurações realizadas tanto por espécime quanto por grupo

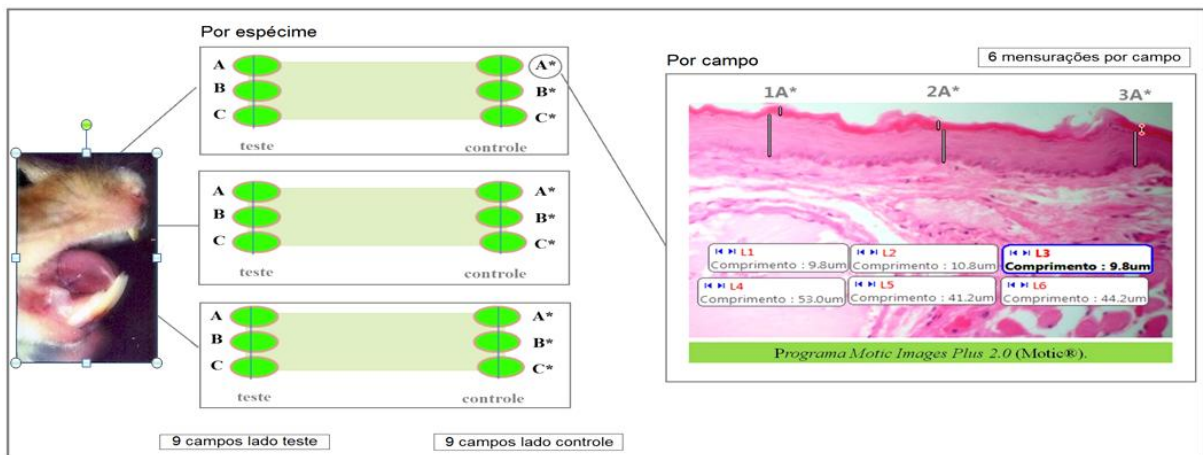
### **Avaliação morfométrica**

As fotomicrografias das lâminas foram realizadas em aumentos de 100 vezes, com auxílio de microscópio de luz (Opton<sup>®</sup>, Guiyang, China) conectado a um sistema de captura de imagens digital (Moticam 1000<sup>®</sup>, Guiyang, China). Em cada lâmina, foram capturados três campos, onde foram analisadas as imagens. A espessura de todo epitélio bucal foi aferida com auxílio do Programa Motic Images Plus 2.0 (Motic<sup>®</sup> China Group CO. LTD. Copyright<sup>®</sup> 2007, Guiyang, China) para análise da imagem digitalizada (Figura 1). Em cada um dos campos foram realizadas seis mensurações, três na camada córnea e três na camada epitelial, sendo uma mensuração no centro e duas nas extremidades. Estas medidas foram obtidas através de um traço perpendicular na camada epitelial investigada. A altura total do epitélio foi encontrada através da soma das duas medidas supracitadas (Quadro 3). A média dos dados obtidos foi tabulada (Apêndice 1).





**Figura 1:** Avaliação morfométrica do tecido epitelial com auxílio do programa Motic Images Plus 2.0



**Quadro 3:** Distribuição dos campos histológicos analisados por espécime e das mensurações realizadas por campo histológico

O tecido epitelial foi classificado, de acordo com sua morfometria em: normal, atrófico e hiperplásico. Foi considerado atrófico o tecido que apresentou diminuição de sua espessura, em relação ao lado controle. Foi considerado hiperplásico o tecido que apresentou aumento de sua espessura em relação ao lado controle.

### **Análise estatística**

Os dados coletados foram analisados pelo software SPSS (Statistical Package for Social Sciences, IBM Inc., USA) versão 17.0. Foram realizadas análises de estatística

descritiva. A normalidade e homogeneidade de variância dos dados foram verificadas pelos testes Shapiro-Wilk e teste de Levene, respectivamente. Realizou-se análise bivariada com o objetivo de se verificar possíveis diferenças entre os grupos. Para análises intragrupo e intergrupo, os resultados foram submetidos, respectivamente, ao teste de Wilcoxon e ao teste de Mann-Whitney. Foi adotado o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).



---

***3 ARTIGO***

**JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY E MEDICINE**

**3 ARTIGO \*****ANÁLISE COMPUTADORIZADA DA ESPESSURA DE LÍNGUA TRATADA COM  
BEBIDAS ALCOÓLICAS DESTILADAS**

Rafaela Nogueira Moreira<sup>1</sup>, Sandra Aparecida Marinho<sup>3</sup>, Flaviana Dornela Verli<sup>2</sup>, Dhelfeson Willya Douglas de Oliveira<sup>1</sup>, Nádia Lages Lima<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudante de Pós-Graduação, Departamento de Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil. <sup>2</sup> PhD, Professora, Departamento de Ciências Básicas, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, Brasil. <sup>3</sup> PhD, Professora, Curso de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campus VIII, Araruna, PB, Brasil.

Endereço para correspondência:  
Rafaela Nogueira Moreira  
Street: Rua da Glória, 187, campus I  
Prédio 2- sala 22- Laboratório de Patologia- UFVJM  
Centro  
Diamantina, Minas Gerais, Brazil  
Zipcode: 39100-000  
Tel /Fax: +55 38 – 3532-6000  
email: [rafismm@yahoo.com.br](mailto:rafismm@yahoo.com.br)

**Resumo**

**INTRODUÇÃO:** Bebidas alcoólicas podem promover alterações morfológicas sobre o tecido epitelial. O objetivo do estudo foi observar alterações na espessura epitelial após aplicação tópica de cachaça e uísque em mucosa lingual de *hamsters*.

**MÉTODOS:** Foram avaliados 720 campos microscópicos, com mensuração da espessura total do epitélio de língua de quarenta *hamsters*, divididos em dois grupos experimentais: grupo 1 (cachaça 48°gl) e grupo 2 (uísque 40°gl), ambos avaliados em períodos experimentais de 13 e 20 semanas. Os dados da análise morfométrica foram avaliados por estatística descritiva, teste de Wilcoxon e teste de Mann-Whitney.

**RESULTADOS:** No grupo cachaça, em relação à espessura total do epitélio, houve diferença estatística significativa entre a média do lado teste, com 61,87 (14,75) $\mu\text{m}$  e a média do lado controle, com 67,20 (9,96) $\mu\text{m}$  ( $p=0,044$ ). Neste grupo, observou-se uma redução significativa da espessura das camadas epitelial ( $p<0,001$ ) e córnea ( $p=0,021$ ). No período de 13 semanas, houve diminuição estatística significativa da espessura das camadas córnea ( $p=0,032$ ) e epitelial ( $p<0,001$ ), enquanto que, em 20 semanas, somente a camada epitelial apresentou-se reduzida ( $p=0,002$ ). No grupo uísque, houve aumento significativo da espessura das camadas córnea ( $p=0,015$ ) e epitelial ( $p=0,012$ ), após 13 semanas.

**CONCLUSÃO:** Diferentes concentrações de bebidas alcoólicas destiladas promoveram alterações morfológicas e morfométricas distintas. Enquanto a cachaça com 48°gl, promoveu atrofia epitelial, o uísque, com 40°gl, promoveu hiperplasia epitelial.

**Palavras-chave:** bebidas alcoólicas, mucosa bucal, língua.

## Introdução

Substâncias contendo álcool são amplamente consumidas no mundo inteiro. Pouco mais de 40% da população adulta do mundo consome álcool e a média de consumo por indivíduo é de 17,1 litros anuais (1). Efeitos do álcool têm sido relacionados com alterações na arquitetura da membrana de células epiteliais e na proliferação celular, além de alterações dos processos responsáveis pela preservação do meio citosólico e inibição da síntese de proteínas e ácidos nucléicos (2). Porém a etiologia das alterações em mucosa bucal promovidas pelo álcool deve ser mais elucidada (2, 3).

A ingestão crônica de álcool exerce efeitos moleculares diversos tais como: estresse oxidativo decorrente do seu metabolismo (4); desregulação de citocinas pró-inflamatórias (5); aumento da liberação de endotelina 1 (ET-1); alterações do óxido nítrico (NO) (3); alterações nos processos de sinalização iniciada pelo receptor do fator de crescimento fibroblástico beta (bFGF-R) (6) e diminuição dos níveis de vitamina A nas estruturas bucais (7).

Na mucosa bucal, acredita-se que o álcool promova uma alteração morfológica caracterizada por atrofia do epitélio seguida de hiper-regeneração da camada basal (8-10). A redução da espessura do epitélio aumenta a vulnerabilidade frente aos agentes nocivos e químicos, permitindo a penetração de agentes carcinogênicos através da mucosa (4, 7, 11, 12). Embora haja um consenso de que o álcool, juntamente com o acetaldeído sejam os principais agentes carcinogênicos em bebidas alcoólicas, outros constituintes e contaminantes podem adicionalmente contribuir para alterações morfológicas e para a carcinogenicidade (13), tais como chumbo, nitrato, pesticidas, micotoxinas e carbamato de etila (14).

O exato mecanismo do álcool na alteração do tecido epitelial permanece incerto e diferentes bebidas alcoólicas podem ter diferentes ações teciduais (15, 16). Embora alguns estudos têm mostrado que o álcool puro promova alterações morfológicas na mucosa bucal (9, 10, 17), poucos avaliaram os efeitos tópicos de bebidas alcoólicas em mucosa (18, 19). Além disso, não foram encontrados estudos que avaliem morfometricamente os efeitos de bebidas alcoólicas em mucosa bucal. Diante disso, a proposta do presente estudo foi verificar os efeitos da aplicação tópica de duas bebidas alcoólicas destiladas, cachaça e o uísque, na espessura epitelial da mucosa lingual de *hamsters*.

## Material e métodos

Foram utilizados 40 *hamsters* (*Mesocricetus auratus*) machos e fêmeas, com idade média de 90 dias, pesando em média 158,5g. Os animais foram alimentados com ração balanceada (Nuvilab CR1, Nuvital<sup>®</sup>, Colombo, Paraná, Brasil) e água *ad libitum*. O

experimento foi realizado após aprovação (protocolo nº 008/11) da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (CEUA/UFVJM).

Para o cálculo do tamanho amostral, utilizou-se a fórmula para comparação de médias adotando um nível de significância de 95%, poder estatístico de 80%, desvio-padrão de 3,76 $\mu$ m e uma diferença mínima a ser detectada entre os grupos de 0,8 $\mu$ m (20), chegando-se a 170 campos histológicos a serem investigados por lado em cada grupo (cachaça e uísque), totalizando, no mínimo, 680 campos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais (cachaça e uísque). As substâncias testadas em cada grupo experimental foram cachaça 48°gl (grupo 1) e uísque 40°gl (grupo 2), ambos avaliados em períodos experimentais de 13 e 20 semanas. Para ambos os grupos, houve mensuração da espessura epitelial da língua dos lados teste (direito) e controle (esquerdo), após aplicação tópica das bebidas, que foi realizada em dias alternados, por meio de um pincel de pêlo de camelo, número zero (Tigre®, São Paulo, Brasil).

Após 13 e 20 semanas do início do experimento, os animais foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de 10mg/Kg de xilazina injetável (Anacedan®, Laboratório Agribrands, SP) associada à 200mg/Kg de quetamina (Dopamim®, Laboratório Agribrands, SP). Os animais foram decapitados e as suas cabeças imediatamente submersas em solução de formol 10% tamponado, por 48 horas. Após fixadas, a mandíbula e a língua foram separadas da maxila, para melhor acesso às estruturas. Em seguida, foi realizada a dissecação da língua e sua macroscopia. A língua foi dividida, por corte transversal, em terços apical, médio e posterior. O terço médio foi submetido ao processamento histológico e incluído em parafina para a secção. Foram realizados cortes transversais seriados, sendo que para cada lâmina obtida descartavam-se 5 cortes. Foram obtidas cinco lâminas de cada espécime e destas, avaliaram-se as lâminas ímpares (n=3), que foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina (HE).

A avaliação morfológica descritiva foi realizada por um único examinador, devidamente calibrado e cego para os diferentes grupos. Para isso, foi utilizado um microscópio de luz (Opton®, Guiyang, China), com aumento de 100, 200 e 400 vezes. Para análise morfométrica, as lâminas foram fotomicrografadas por um sistema de captura de imagens digital (Moticam 1000®, Guiyang, China), conectado ao microscópio, utilizando-se aumento de 100 vezes. Em cada lâmina foram capturados três campos de cada bordo lingual, onde foram analisadas as imagens e realizadas as aferições. A espessura do epitélio bucal foi aferida com auxílio do Programa Motic Images Plus 2.0 (Motic® China Group CO. LTD. Copyright© 2007, Guiyang, China), para análise da imagem digitalizada. Em cada um dos

campos foram realizadas seis mensurações, três na camada córnea e três na camada epitelial, sendo uma no centro e duas nas extremidades do campo. As medidas foram obtidas através de um traço perpendicular na camada epitelial investigada. A altura total do epitélio foi encontrada através da soma da camada córnea com a epitelial e a média dos dados obtidos foi tabulada.

O tecido epitelial foi classificado, de acordo com sua morfometria em: normal, atrófico e hiperplásico. Foi considerado atrófico o tecido que apresentou diminuição em sua espessura, em relação ao lado controle. Foi considerado hiperplásico o tecido que apresentou aumento de sua espessura em relação ao lado controle.

Os dados coletados foram analisados pelo *software* SPSS (Statistical Package for Social Sciences, IBM Inc., USA) versão 17.0. Foram realizadas análises de estatística descritiva e a normalidade e homogeneidade de variância dos dados foram verificadas pelos testes Shapiro-Wilk e teste de Levene, respectivamente. Realizou-se análise bivariada para verificação de possíveis diferenças entre os grupos. Para análise intragrupo e intergrupo, os resultados foram submetidos respectivamente ao teste de Wilcoxon e ao teste de Mann-Whitney. Foi adotado o nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

Foram analisados 342 campos microscópicos no grupo cachaça (lados teste e controle) e 342 campos no grupo uísque (lados teste e controle), totalizando 684 campos. Dezoito campos do grupo cachaça foram excluídos por apresentarem descontinuidade do tecido ou presença de artefato de técnica. Dezoito campos do grupo uísque não foram mensurados devido à morte de um animal (Quadro 1).

Em relação à espessura total do epitélio, para o grupo cachaça, houve diferença estatística significativa entre as médias das espessuras dos lados teste e controle ( $p = 0,044$ ). Entretanto, esta diferença não foi significativa para o grupo uísque ( $p = 0,450$ ) (Tabela 1).

No grupo cachaça, observou-se uma redução significativa das espessuras das camadas epitelial ( $p < 0,001$ ) e córnea ( $p = 0,021$ ), quando comparadas ao lado controle. (Tabela 2 e Figura 1). Para o grupo uísque, não houve diferença estatística significativa entre os lados teste e o controle, quando se analisaram as camadas córnea ( $p = 0,512$ ) e epitelial ( $p = 0,256$ ) isoladamente (Tabelas 3 e Figuras 2 e 3).

Em 13 semanas, no grupo cachaça, houve diminuição estatística significativa da espessura das camadas córnea ( $p = 0,032$ ) e epitelial ( $p < 0,001$ ), no lado teste. Em 20 semanas, somente a camada epitelial apresentou-se significativamente reduzida ( $p = 0,002$ ). Para o lado



teste do grupo uísque, em 13 semanas, houve aumento significativo das espessuras da camada córnea ( $p=0,015$ ) e epitelial ( $p=0,012$ ), o que não ocorreu em 20 semanas (Tabela 4).

Comparando-se, isoladamente, a espessura das camadas córnea e epitelial do lado teste, no período de 13 semanas, com a espessura dessas no período de 20 semanas, verificou-se diferença estatística apenas para a camada córnea, tanto para o grupo cachaça quanto para o grupo uísque (Tabela 5). Para o lado controle, essa diferença foi observada para a camada epitelial do uísque (Tabela 6).

### **Discussão**

O presente estudo demonstrou que a aplicação tópica de cachaça e uísque promoveram alterações morfológicas e morfométricas distintas na mucosa de língua de hamsters. Graus variados de danos ao tecido podem depender da concentração alcoólica utilizada, corroborando assim, o apresentado pela literatura (21). Embora nas bebidas avaliadas no presente estudo, a graduação alcoólica de Gay-Lussac fosse maior na cachaça (48°gl), as alterações morfológicas observadas no grupo uísque (40°gl) foram mais avançadas. O aumento da espessura epitelial observado para o grupo uísque em 13 semanas foi devido à presença de hiperplasia basal. Além disso, foi observada também a presença de hiperchromatismo nuclear neste grupo. Esses achados também foram descritos por Martinez et al. (2005) (17), ao avaliarem os efeitos da ingestão do álcool puro na ultraestrutura da mucosa do palato duro. A ocorrência de hiperplasia da camada basal associada ao hiperchromatismo nuclear no grupo uísque são alterações citológicas que indicam início de alterações displásicas, que ocorrem em lesões epiteliais pré-malignas (22). Como o mesmo não ocorreu no grupo cachaça, pode-se sugerir que os componentes bioquímicos contidos no uísque, principalmente os hidrocarbonetos policíclicos, favoreceram alterações no ciclo celular (23). Além disso, devido sua maior concentração em relação ao uísque, a cachaça pode ter atuado como agente fixativo, agindo em um nível mais superficial (24, 25)

As análises morfométricas mostraram que a ação tópica da cachaça promoveu atrofia da espessura epitelial, sendo esses valores também estatisticamente significantes ao se considerar isoladamente as camadas córnea e epitelial. Esses resultados se assemelham aos da literatura (9, 10). A atrofia, ocorrida no grupo cachaça, foi percebida nos dois tempos experimentais analisados para a camada epitelial. Porém, a camada córnea apresentou-se reduzida apenas no período de 13 semanas. A atrofia do epitélio ocorreu, provavelmente, como resultado da ação do álcool pelo bloqueio de processos enzimáticos celulares, com redução da produção de energia e de seu metabolismo (26). Sabe-se que a redução da

espessura do epitélio aumenta a vulnerabilidade frente aos agentes nocivos e químicos, permitindo a penetração de agentes carcinogênicos através da mucosa (4, 7, 11, 12).

As diferenças morfométricas e morfológicas observadas no presente estudo entre o grupo cachaça e uísque contradizem os achados de Maserejian et al. (2006) (27) que, em um estudo de coorte prospectivo, observaram associação do álcool com grande risco de desenvolvimento de lesões pré-malignas, independente do tipo de bebida alcoólica, tempo de uso e frequência de ingestão da mesma. Tais autores consideram que possíveis diferenças em relação ao tipo de bebida alcoólica podem estar relacionadas ao tipo de bebida mais consumida numa dada população, hábito de beber durante as refeições e concentração do álcool consumida. Entretanto, todos esses fatores são possíveis de serem controlados em estudos experimentais.

Apesar da existência de muitos estudos que avaliaram os efeitos do consumo do álcool no organismo (2, 3, 5, 10, 12, 28, 29, 30, 31-37), com alguns evidenciando alterações morfológicas na mucosa (8-10, 17-19), a comparação dos mesmos entre si e com o presente estudo é dificultada pela falta de padronização metodológica, com diferenças nas espécies animais utilizadas, dieta das mesmas, concentração, tipo de administração (via oral ou tópica), tempo e forma de administração do álcool. Pelos curtos tempos experimentais deste estudo, não foram encontrados sinais de metaplasia nem neoplasia. Entretanto, o álcool já é apontado também como um possível iniciador do processo da carcinogênese (31,38).

Mais estudos avaliando a ação de bebidas alcoólicas na superfície dos tecidos são necessários, visto que a maioria das pesquisas se concentra nos efeitos do álcool puro e que existem outros componentes presentes nas bebidas, que podem ter ação coadjuvante nas alterações teciduais e na carcinogênese. Estudos que avaliam a composição química das bebidas podem contribuir para o grau de evidência em relação à atuação do álcool na mucosa bucal. A escolha das bebidas utilizadas na presente pesquisa se justifica por se tratarem de bebidas destiladas de teor alcoólico aproximado e com composições químicas distintas (39,40). Além disso, a cachaça está entre as bebidas mais amplamente consumidas pela população brasileira (41).

A análise morfométrica realizada no presente estudo oferece vantagens, graças ao aumento da objetividade, fácil reprodutibilidade e possibilidade de comparação dos resultados obtidos. Outra vantagem deste processo é a sua contribuição para o estudo da estrutura epitelial, permitindo-se criar um perfil binário dessas estruturas em amostras submetidas a coloração de hematoxilina-eosina (42). No entanto, esta técnica têm algumas limitações, incluindo a natureza bidimensional do plano de corte tecidual e a possível variação dos

resultados em relação aos verdadeiros valores do objeto em estudo. O conhecimento destas desvantagens é de ajuda para controlá-las, através da correta seleção dos planos de corte em relação à distribuição dos diferentes elementos dos tecidos. Em todos os casos, é importante selecionar planos perpendiculares, e com a mesma ampliação (42).

De acordo com os dados do presente estudo, pode-se concluir que tipos diferentes de bebidas alcoólicas destiladas, com concentrações alcoólicas de 40°gl e 48°gl, promoveram alterações morfométricas e morfológicas diferentes. A cachaça promoveu atrofia epitelial, o que poderia facilitar a penetração de agentes carcinogênicos, e o uísque promoveu hiperplasia epitelial, especialmente da camada basal, o que pode sugerir o início de desenvolvimento de lesões pré-malignas. Mais estudos são necessários, com maiores tempos experimentais de avaliação, para comparação dos verdadeiros efeitos das bebidas alcoólicas na mucosa epitelial.

**Tabela 1.** Espessura total do epitélio (camada córnea mais epitelial) para lados teste e controle dos grupos cachaça e uísque.

	Espessura total do epitélio					
	Cachaça			Uísque		
	Média (DP) µm	Mediana (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	p*	Média (DP) µm	Median (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	p*
<b>Controle</b>	67,20 (9,96)	67,68 (57,85 – 71,74)	0,044	64,76 (11,33)	62,61 (56,45 – 75,76)	0,450
<b>Teste</b>	61,87 (14,75)	59,77 (53,39 – 64,09)		67,83 (9,93)	65,17 (59,78 – 76,54)	

\* Wilcoxon test

**Tabela 2.** Espessura das camadas córnea e epitelial do grupo cachaça.

	Camada Córnea			Camada Epitelial		
	Média (DP) µm	Mediana (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	p*	Média (DP) µm	Mediana (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	p*
<b>Controle</b>	14,94 (4,69)	14,00 (12,36 – 17,20)	0,021	52,31 (11,27)	52,10 (43,03 – 60,83)	<0,001
<b>Teste</b>	14,80 (8,54)	13,00 (10,66 – 15,33)		46,60 (12,39)	45,30 (38,06 – 54,83)	

\* Wilcoxon test

**Tabela 3.** Espessura das camadas córnea e epitelial do grupo uísque.

	Camada Córnea			Camada Epitelial		
	Média (DP) µm	Mediana (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	p*	Média (DP) µm	Mediana (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	p*
<b>Controle</b>	14,55 (4,35)	13,93 (11,08 – 16,56)	0,512	51,05 (11,69)	58,04 (48,13 – 68,25)	0,256
<b>Teste</b>	14,95 (5,09)	13,46 (11,51 – 17,46)		52,87 (13,76)	62,44 (52,96 – 69,60)	

\* Wilcoxon test

**Tabela 4.** Espessura das camadas córnea e epitelial de acordo com o tempo de aplicação das substâncias

	13 semanas			20 semanas		
	Média (DP) µm	Mediana (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	p*	Média (DP) µm	Median (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	p*
<b>Camada Córnea da Cachaça</b>						
Controle	15,63 (5,51)	14,26 (12,07 – 17,08)	0,032	14,21 (3,54)	13,86 (11,51 – 16,81)	0,284
Teste	15,80 (11,51)	11,96 (10,06 – 14,96)		13,76 (3,18)	13,73 (11,50 – 15,93)	
<b>Camada Epitelial da Cachaça</b>						
Controle	51,64 (11,33)	52,13 (42,83 – 60,53)	<0,001	53,01 (11,24)	52,03 (46,03 – 61,47)	0,002
Teste	45,90 (12,56)	44,06 (38,06 – 51,93)		47,33 (12,24)	46,31 (38,01 – 56,22)	
<b>Camada Córnea do Uísque</b>						
Controle	13,80 (3,49)	13,43 (11,19 – 16,52)	0,015	15,15 (4,88)	14,13 (12,25 – 16,89)	0,236
Teste	15,90 (4,50)	14,74 (12,63 – 19,18)		14,19 (5,43)	13,00 (10,69 – 17,11)	
<b>Camada Epitelial do Uísque</b>						
Controle	46,47 (9,39)	44,26 (39,79 – 52,22)	0,012	54,76 (12,09)	52,60 (45,18 – 61,29)	0,538
Teste	52,16 (14,08)	50,08 (41,75 – 61,91)		53,44 (13,56)	53,73 (43,11 – 63,43)	

\* Wilcoxon test

**Tabela 5.** Espessura das camadas córnea e epitelial do lado teste dos grupos cachaça e uísque em 13 e 20 semanas.

	13 semanas		20 semanas		p*
	Média (DP) µm	Mediana (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	Média (DP) µm	Mediana (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	
Camada Córnea da Cachaça	15,80 (11,51)	11,96 (10,06 – 14,96)	13,76 (3,18)	13,73 (11,50 – 15,93)	0,022
Camada Epitelial da Cachaça	45,90 (12,57)	44,06 (38,06 – 51,93)	47,33 (12,24)	46,31 (38,01 – 56,22)	0,379
Camada Córnea do Uísque	15,90 (4,50)	14,74 (12,63 – 19,18)	14,19 (5,40)	13,05 (10,71 – 17,10)	0,005
Camada Epitelial do Uísque	52,16 (14,08)	50,08 (41,75 – 61,91)	53,64 (13,61)	54,14 (43,23 – 63,86)	0,395

\* Mann-Whitney

**Tabela 6.** Espessura das camadas córnea e epitelial do lado controle dos grupos cachaça e uísque em 13 e 20 semanas.

	13 semanas		20 semanas		p*
	Média (DP) µm	Mediana (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	Média (DP) µm	Mediana (Q <sub>1</sub> – Q <sub>3</sub> ) µm	
Camada Córnea da Cachaça	15,63 (5,51)	14,26 (12,70 – 17,80)	14,21 (3,54)	13,86 (11,51 – 16,81)	0,272
Camada Epitelial da Cachaça	51,64 (11,33)	52,13 (42,83 – 60,53)	53,01 (11,24)	52,03 (46,03 – 61,47)	0,526
Camada Córnea do Uísque	13,80 (3,49)	13,43 (11,19 – 16,52)	15,15 (4,88)	14,13 (12,25 – 16,89)	0,147
Camada Epitelial do Uísque	46,47 (9,39)	44,26 (39,79 – 52,22)	54,76 (12,09)	52,60 (45,18 – 61,29)	<0,001

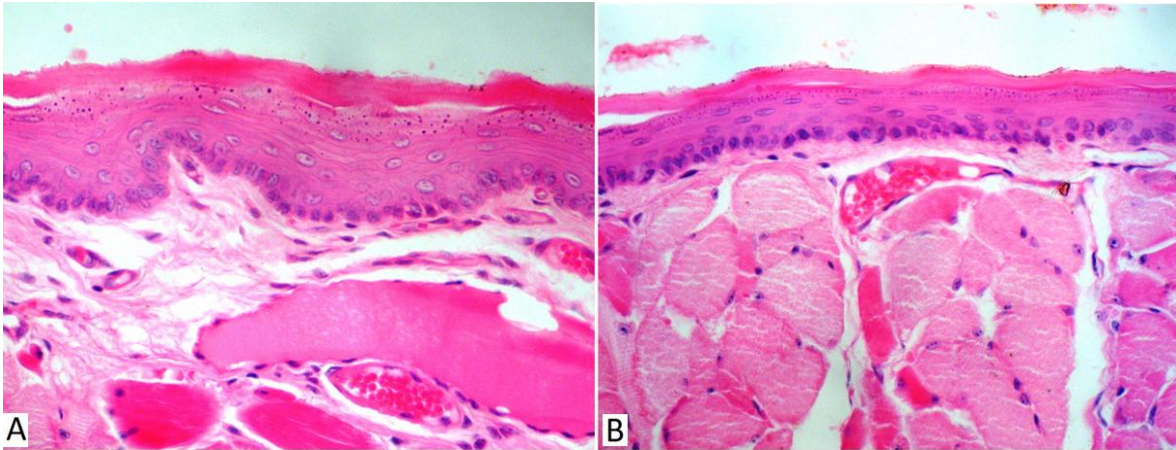
\* Mann-Whitney

	Lâminas	Fotomicrografias	Campos microscópicos	Mensurações
Por Espécime	3	18	18	108
Por Grupo	60	360	360	2.160
Total	117*	702*	684**	4.104

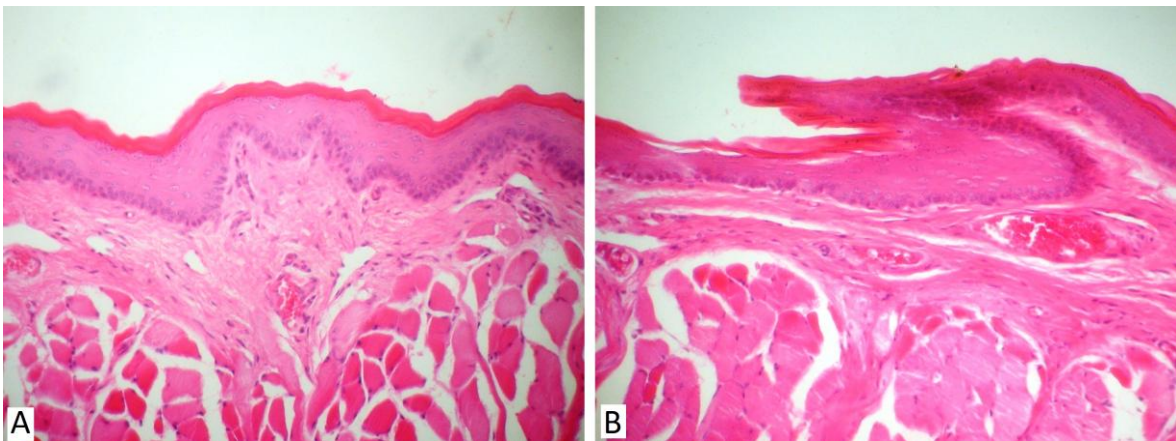
\* Perda por morte de um animal do grupo uísque

\*\* Perda de 18 campos em cada grupo

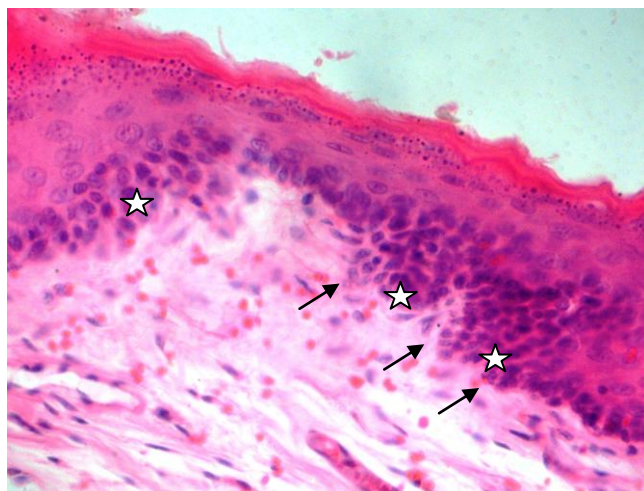
**Quadro 1:** Distribuição do número de lâminas histológicas, fotomicrografias, campos microscópicos e mensurações realizadas tanto por espécime quanto por grupo



**Figura 1-** Fotomicrografias do epitélio de língua do grupo cachaça: (A) lado controle (B) lado teste. HE, 200X.



**Figura 2-** Fotomicrografias do epitélio de língua do grupo uísque: (A) lado controle (B) lado teste. HE, 100X.



**Figura 3-** Fotomicrografia do epitélio de língua do grupo uísque (lado teste). Presença de hiper cromatismo nuclear (estrelas) e hiperplasia basilar (setas). HE, 200X.

## Referências

- 1-SHIELD KD, RYLETT M, GMEL G, GMEL G, KEHOE-CHAN TA, REHM J. Global alcohol exposure estimates by country, territory and region for 2005--a contribution to the Comparative Risk Assessment for the 2010 Global Burden of Disease Study. *Addiction* 2013; 108: 912-22.
- 2-SLOMIANY BL, PIOTROWSKI J, PIOTROWSKI E, SLOMIANY A. Induction of buccal mucosal apoptosis with chronic alcohol ingestion. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 44: 381-9.
- 3-SLOMIANY BL, PIOTROWSKI J, PIOTROWSKI E, SLOMIANY A. Activation of apoptotic caspase-3 and nitric oxide synthase-2 in buccal mucosa with chronic alcohol ingestion. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 45: 1199-209.
- 4-SZACHOWICZ-PETELSKA B, DOBRZYŃSKA I, SKRZYDLEWSKA E, FIGASZEWSKI Z. Protective effect of blackcurrant on liver cell membrane of rats intoxicated with ethanol. *J Membr Biol* 2012; 245: 191-200.
- 5-SLOMIANY BL, PIOTROWSKI J, SLOMIANY A. Alterations in buccal mucosal endothelin-1 and nitric oxide synthase with chronic alcohol ingestion. *Biochem Mol Biol Int* 1998; 45: 681-8.
- 6-SLOMIANY BL, PIOTROWSKI J, SLOMIANY A. Effect of chronic alcohol ingestion on buccal mucosal expression of bFGF and Cdk2 during ulcer healing. *Biochem Mol Biol Int* 1988; 46: 963-971.
- 7-SEITZ HK, MATSUZAKI S, YOKOYAMA A, HOMANN N, VÄKEVÄINEN S, WANG XD. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; 25: 137S-143S.
- 8-MASCRÈS C, MING-WEN F, JOLY JG. Morphologic changes of the esophageal mucosa in the rat after chronic alcohol ingestion. *Exp Pathol* 1984; 25: 147-53.
- 9-VALENTINE JA, SCOTT J, WEST CR, ST HILL CA. A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. *Oral Pathol* 1985; 14: 654-65.
- 10-MAIER H, WEIDAUER H, ZÖLLER J, et al. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res* 1994; 18: 387-91.
- 11-WIGHT AJ, OGDEN GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. *Oral Oncol* 1998; 34: 441-7.
- 12-HOWIE NM, TRIGKAS TK, CRUCHLEY AT, WERTZ PW, SQUIER CA, WILLIAMS DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis* 2001; 7: 349-54.
- 13-REHM J, KANTERES F, LACHENMEIER DW. Unrecorded consumption, quality of alcohol and health consequences. *Drug Alcohol Rev* 2010; 29: 426-36.
- 14-LACHENMEIER DW, LIMA MC, NÓBREGA IC, et al. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. *BMC Cancer* 2010; 10: 266-?.

- 15-LECLERC A, BRUGÈRE J, LUCE D, POINT D, GUENEL P. Type of alcoholic beverage and cancer of the upper respiratory and digestive tract. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1987; 23: 529-34.
- 16-CASTELLSAGUÉ X, QUINTANA MJ, MARTINEZ MC, et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 2004; 108: 741-49.
- 17-MARTINEZ M, MILTON FA, DE OLIVEIRA SA, et al. Ultrastructural changes on the hard palatine mucosa of *Calomys callosus* after 120days of experimental chronic alcoholism. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2005; 37: 59-65.
- 18-LIMA NL. Estudos das Alterações Morfológicas na Carcinogênese Química Bucal comparando-se a indução pelo DMBA e Bebidas Alcoólicas de Alto Teor. Dissertação de Mestrado em Estomatologia, Faculdade Federal de Odontologia de Diamantina, 1997.
- 19-LIMA NL, TAVEIRA LA. de A. Estudo das alterações morfológicas causadas pela indução concomitante de DMBA e bebidas alcoólicas de alto teor na carcinogênese química bucal. *Rev.FOB* 1999, 7: 61-6.
- 20-SALUM FG, CHERUBINI K, DE FIGUEIREDO MA, AMADO M de O, RODRIGUES ET, YURGEL LS. Histologic evaluation of effect of thiocyanate topical application on hamster cheek pouch. *Clin Oral Investig* 2006; 10: 211-5.
- 21-MÜLLER P, HEPKE B, MELDAU U, RAABE G. Tissue damage in the rabbit oral mucosa by acute and chronic direct toxic action of different alcohol concentrations. *Exp Pathol* 1983; 24: 171-81.
- 22-BURZLAFF JB, BOHRER PL, PAIVA RL, et al. Exposure to alcohol or tobacco affects the pattern of maturation in oral mucosal cells: a cytohistological study. *Cytopathology* 2007; 18: 367-75.
- 23-KETCHAM AS, WEXLER H, MANTEL N. Effects of alcohol in mouse neoplasia. *Cancer Res* 1963; 23: 667-70.
- 24-SQUIER CA, COX P. HALL BK. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J Oral Pathol* 1986; 15: 276-9.
- 25-SQUIER CA, KREMER MJ, WERTZ PW. Effect of ethanol on lipid metabolism and epithelial permeability barrier of skin and oral mucosa in the rat. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 595-9.
- 26-FISHER SE, DUFFY L, ATKINSON M. Selective fetal malnutrition: effect of acute and chronic ethanol exposure upon rat placental Na,K-ATPase activity. *Alcohol Clin Exp Res* 1986; 10: 150-3.
- 27-MASEREJIAN NN, JOSHIPURA KJ, ROSNER BA, GIOVANNUCCI E, ZAVRAS AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15 :774-81



- 28-BOR-CAYMAZ C, BOR S, TOBEY NA, ABDULNOUR-NAKHOUL S, ORLANDO RC. Effects of ethanol and extract of cigarette smoke on the rabbit buccal mucosa. *J Oral Pathol Med* 2011; 40: 27-32.
- 29-BRUGERE J, GUENEL P, LECLERC A, RODRIGUEZ J. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth. *Cancer* 1986; 57: 391-5.
- 30-BOFFETTA P, MASHBERG A, WINKELMANN R, GARFINKEL L. Carcinogenic effect of tobacco smoking and alcohol drinking on anatomic sites of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 1992; 52: 530-3.
- 31-OGDEN GR, WIGHT AJ, COWPE JG. Quantitative oral exfoliative cytology. Effect of alcohol on normal buccal mucosa. *Anal Quant Cytol Histol* 1999; 21: 126-30.
- 32-ADEWOLE RA. Alcohol, smoking and oral cancer. A 10-year retrospective study at Base Hospital, Yaba. *West Afr J Med* 2002; 21: 142-5.
- 33-PAVANELLO MB, PRADO FA, BALDUCCI I, BRANDÃO AA, ALMEIDA JD. Cytologic analysis of alterations induced by Smoking and by alcohol consumption. *Acta Cytol* 2006; 50: 435-40.
- 34-REIS SR, DO ESPÍRITO SANTO AR, ANDRADE MG, SADIGURSKY M. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Braz Oral Res* 2006; 20: 97-102.
- 35-AHMED HG, EBNOOF SO, HUSSEIN MO, GBREEL AY. Oral epithelial atypical changes in apparently healthy oral mucosa exposed to smoking, alcohol, peppers and hot meals, using the AgNOR and Papanicolaou staining techniques. *Diagn Cytopathol* 2010; 38: 489-95.
- 36-ABDELAZIZ MS, OSMAN TE. Detection of Cytomorphological Changes in Oral Mucosa among Alcoholics and Cigarette Smokers. *Oman Med J* 2011; 26: 349-52.
- 37-MARTINEZ M, DE OLIVEIRA SA, PINHEIRO PF, et al. IGFR-I expression and structural analysis of the hard palatine mucosa in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *Tissue Cell* 2011; 43: 101-7.
- 38-SIMANOWSKI UA, STICKEL F, MAIER H, GÄRTNER U, SEITZ HK. Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis. *Alcohol* 1995; 12: 111-5.
- 39-BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 29 de Junho de 2005. D.O.U de 30 de jun 2005, Seção I, p. 3.
- 40-YOSHIOKA S, TERASHITA T, YOSHIZUMI H, SHIRASAKA N. Inhibitory effects of whisky polyphenols on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells. *Biosci Biotech Bioch* 2011; 75: 2278-82.
- 41-INSTITUTO BRASILEIRO DA CACHAÇA -IBRAC. Mercado Interno. Brasília, Disponível em: < [http://www.ibrac.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id](http://www.ibrac.net/index.php?option=com_content&view=article&id)

=46&Itemid=47>. Acesso em: 23 out. 2012

42-BLOMGREN B, JOHANNESSON U, BOHM-STARKE N, FALCONER C, HILLIGES M. A computerised, unbiased method for epithelial measurement. *Micron* 2004; 35: 319-29.



#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer. No Brasil, estimam-se 9.990 casos novos de câncer da cavidade bucal em homens e 4.180 em mulheres, no ano de 2012. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10 casos novos a cada 100 mil homens e quatro a cada 100 mil mulheres (INCA, 2013)

Devido o papel do álcool na etiologia do câncer (BAGNARDI et al., 2013), mais estudos que avaliem a ação de bebidas alcoólicas na superfície dos tecidos são necessários, visto que as pesquisas se concentram no efeito do álcool puro, não levando em consideração que a presença de outros componentes presentes nas bebidas podem ter ação coadjuvante nas alterações teciduais e na carcinogênese.



## REFERÊNCIAS

- BAGNARDI, V. et al. Light alcohol drinking and cancer: a meta-analysis. **Annals of Oncology**, Milano, v. 24, n. 2, p. 301-308, Feb 2013.
- BLOT, W. J. et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Research**, Bethesda, v. 48, n. 11, p. 3282-3287, Jun 1988.
- BOR-CAYMAZ, C. et al. Effects of ethanol and extract of cigarette smoke on the rabbit buccal mucosa. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Izimir, v. 40, n. 1, p. 27-32, Jan. 2011.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 29 de Junho de 2005. D.O.U de 30 de jun 2005, Seção I, p. 3.
- CASTELLSAGUÉ, X. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, Barcelona, v. 108, n. 5, p. 741-749, Fev. 2004.
- DOORN, J. A.; PETERSEN, D. R. Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. **Chemical Research in Toxicology**, Denver, v. 15, n. 11, p. 1445-1450, Nov. 2002.
- FIGUERO-RUIZ, E. et al. Efectos del consumo de alcohol etílico en la cavidad oral: Relación con el cáncer oral. **Medicina Oral**, Madrid, v. 9, p. 14-23, 2004.
- GRIMSRUD, P. A. et al. Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes. **The Journal of Biological Chemistry**, Minneapolis, v. 283, n. 32, p. 21837-21841, Aug. 2008.
- GORAL, J.; KARAVITIS, J.; KOVACS, E. J. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. **Alcohol**, Downers Grove, v. 42, n. 4, p. 237-247, Jun. 2008.
- HERON, M. Deaths: leading causes for 2007. **National Vital Statistics Reports**, Hyattsville, v. 59, n. 10, p. 1-95, Aug 2011.
- HOWIE, N. M. et al. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. **Oral Diseases**, London, v. 7, n. 6, p. 349-354, Nov. 2001.
- INCA- **Instituto Nacional do Câncer**. Estatística do Câncer 2012. Disponível em:< <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>>. Acesso em 24/04/2013.
- LACHENMEIER, D. W. et al. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. **BioMed Central Cancer**, São Paulo, v. 10, p. 266, Jun. 2010.
- LECLERC, A. et al. Type of alcoholic beverage and cancer of the upper respiratory and digestive tract. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, Paris, v. 23, n. 5, p. 529-534, May. 1987.
- LL, Nádia. **Estudos das Alterações Morfológicas na Carcinogênese Química Bucal**

**comparando-se a indução pelo DMBA e Bebidas Alcoólicas de Alto Teor.** Diamantina: FAFEOD, 1997. 102 p. Dissertação (Mestrado em Estomatologia)- Faculdade Federal de Odontologia de Diamantina, Diamantina. 1997.

LIMA, N. L.; TAVEIRA, L. A. de A. Estudo das alterações morfológicas causadas pela indução concomitante de DMBA e bebidas alcoólicas de alto teor na carcinogênese química bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Bauru, V. 7, n. 1/2, p. 61-66, Jan./Jun. 1999.

MAIER, H. et al. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Heidelberg, v. 15, n. 2, p. 387-391, Apr. 1994.

MARTINEZ, M. et al. Ultrastructural changes on the hard palatine mucosa of *Calomys callosus* after 120 days of experimental chronic alcoholism. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, São Carlos, v. 37, n. 1, p. 59-65, Apr. 2005.

MASCRÈS, C.; MING-WEN, F.; JOLY, J. G. Morphologic changes of the esophageal mucosa in the rat after chronic alcohol ingestion. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 25, n. 3, p. 147-153, 1984.

PONNAPPA, B. C.; RUBIN, E. Modeling alcohol's effects on organs in animal models. **Alcohol Research & Health**, Philadelphia, v. 24, n. 2, p. 93-104, 2000.

REHM, J.; KANTERES, F.; LACHENMEIER, D. W. Unrecorded consumption, quality of alcohol and health consequences. **Drug and Alcohol Review**, Toronto, v. 29, n. 4, p. 426-436, Jul 2010.

ROGERS, M. A. M. et al. Consumption of nitrate, nitrite, and nitrosodiethylamine and the risk of upper aerodigestive tract cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, New York, v. 4, p. 29-36, 1995.

SALUM, F. G. et al. Histologic evaluation of effect of thiocyanate topical application on hamster cheek pouch. **Clinical Oral Investigations**, Porto Alegre, v. 10, n. 3, p. 211-215, Jun 2006.

SEITZ, H. K. et al. Alcohol and cancer. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Heidelberg, v. 25, n. 5, p. 137S-143S, May 2001.

SHIELD, K. D. et al. Global alcohol exposure estimates by country, territory and region for 2005-a contribution to the Comparative Risk Assessment for the 2010 Global Burden of Disease Study. **Addiction**, Toronto, v. 108, n. 5, p. 912-922, May 2013.

SLOMIANY, B. L. et al. Induction of buccal mucosal apoptosis with chronic alcohol ingestion. **Biochemistry & Molecular Biology International**, New Jersey, v. 44, n. 2, p. 381-389, Feb 1998<sub>a</sub>.

SLOMIANY, B. L.; PIOTROWSKI, J.; SLOMIANY, A. Alterations in buccal mucosal endothelin-1 and nitric oxide synthase with chronic alcohol ingestion. **Biochemistry & Molecular Biology International**, New Jersey, v. 45, n. 4, p. 681-688, Jul 1998<sub>b</sub>.

SLOMIANY, B. L. et al. Activation of apoptotic caspase-3 and nitric oxide synthase-2 in buccal mucosa with chronic alcohol ingestion. **Biochemistry & Molecular Biology International**, New Jersey, v. 45, n. 6, p. 1199-1209, Sep 1998<sub>c</sub>.

SLOMIANY, B. L.; PIOTROWSKI, J.; SLOMIANY, A. Effect of chronic alcohol ingestion on buccal mucosal expression of bFGF and Cdk2 during ulcer healing. **Biochemistry & Molecular Biology International**, New Jersey, v. 46, n. 5, p. 963-971, Dec 1998<sub>d</sub>.

SZACHOWICZ-PETEŁSKA, B. et al. Protective effect of blackcurrant on liver cell membrane of rats intoxicated with ethanol. **The Journal of Membrane Biology**, Białystok, v. 245, n. 4, p. 191-200, Apr 2012.

VALENTINE, J. A. et al. A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. **Journal of oral pathology**, v. 14, n. 8, p. 654-665, Sep 1985.

VALLETT, M. et al. Free radical production during ethanol intoxication, dependence, and withdrawal. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, Oklahoma City, v. 21, n. 2, p. 275-285, Apr 1997.

WAGNER, B. A.; BUETTNER, G. R.; BURNS, C. P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. **Biochemistry**, Iowa City, v. 33, n. 15, p. 4449-4453, Apr 1994.

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

YOSHIOKA, S. et al. Inhibitory effects of whisky polyphenols on melanogenesis in mouse B16 melanoma cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Nara, v. 75, n. 12, p. 2278-2282, Dec 2011.

XU, X. et al. Is ethanol consumption beneficial for oral lichen planus? **Medical Hypotheses**, Wenzhou City, v. 72, n. 6, p. 640-642, Jun 2009.





**UFVJM**

---

*APÊNDICE*





## ANEXO 1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Diamantina, 23 de setembro de 2011.

### O Projeto de: Pesquisa

**Protocolado sob n°:** 008/11  
**Intitulado:** "Alterações epiteliais morfológicas e morfológicas causadas por bebidas alcoólicas destiladas em língua de hamsters"  
**Pesquisador (a) responsável:** Prof.ª. Nádia Lages Lima  
**Universidade/Faculdade/Departamento** UFVJM / FCBS/ Departamento de Ciências Básicas

Foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFVJM em 23 de setembro de 2011.

Cristiane Tolentino Machado

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais / UFVJM

**Campus JK**  
 Comissão de Ética no Uso de Animais/ UFVJM  
 Prédio da Reitoria-PRPPG- Rodovia MGT 367  
 - Km 583, nº 5000n/Alto da Jacuba - Diamantina/MG –  
 CEP 39100-000 Telefone: +55 (38) 3532-1200

**CEUA** Comissão de Ética  
 no Uso de Animais

## ANEXO 2

### NORMAS PARA PUBLICAÇÃO JOURNAL OF ORAL PATHOLOGY & MEDICINE

**Edited by:** Erik Dabelsteen

**Online ISSN:** 1600-0714

**ISI Journal Citation Reports® Ranking:** Ranking: 2011: 28/81 (Dentistry Oral Surgery & Medicine); 44/79 (Pathology)

**Impact Factor:** 1.628

### Author Guidelines

**Content of Author Guidelines:** 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance

**Relevant Documents:** Copyright Transfer Agreement

**Useful Websites:** Submission Site, Articles published in Journal of Oral Pathology & Medicine, Author Services, Blackwell Publishing's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.



#### 1. GENERAL

*Journal of Oral Pathology & Medicine* publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology. Review papers on topical and relevant subjects will receive a high priority and articles requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as brief reports not exceeding three printed pages. All submitted manuscripts falling within the overall scope of the Journal will be assessed by suitably qualified reviewers, but manuscripts in an incorrect format will be returned to the author without review.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Oral Pathology & Medicine*.

Authors are encouraged to visit [Wiley-Blackwell Publishing Author Services](#) for further information on the preparation and submission of articles and figures.

### **Note to NIH Grantees**

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate).

## **2. ETHICAL GUIDELINES**

*Journal of Oral Pathology & Medicine* adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

### **2.1. Authorship and Acknowledgements**

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

*Journal of Oral Pathology & Medicine* adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

### **2.2. Ethical Approvals**

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 [www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm)) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the

USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

### **2.3 Clinical Trials**

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

*Journal of Oral Pathology & Medicine* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

### **2.4 Conflict of Interest**

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? Please enclose this information under the heading 'Conflict of Interest Statement'.

### **2.5 Appeal of Decision**

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by emailing the editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

### **2.6 Permissions**

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

### **2.7 Copyright Assignment**

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work and its essential substance have not been published before and is not being considered for publication elsewhere. The submission of the manuscript by the authors means that the authors automatically agree to assign exclusive copyright to Wiley-Blackwell if and when the manuscript is accepted for publication. The work shall not be published elsewhere in any language without the written consent of the publisher. The articles published in this journal are protected by copyright, which covers translation rights and the exclusive right to reproduce and distribute all of the articles printed in the journal. No material published in the journal may be stored on microfilm or videocassettes or in electronic database and the like or reproduced photographically without the prior written permission of the publisher.

Authors will be required to sign a Copyright Transfer Agreement (CTA) for all papers accepted for publication. Signature of the CTA is a condition of publication and papers will not be passed for production unless a signed form has been received. Please note that signature of the Copyright Transfer Agreement does not affect ownership of copyright in the material. (Government employees need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned). After submission authors will retain the right to publish their paper in various medium/circumstances (please see the form for further details). To assist authors, an appropriate form will be supplied by the editorial office.

Alternatively, authors may like to download a copy of the form from [www.wiley.com/go/ctaaglobal](http://www.wiley.com/go/ctaaglobal).

Authors must send the completed CTA upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e., do not send the form at submission. Please email or fax the completed form back to the Production Editor (contact details below).

Arun Prasath Kanagarajan  
Production Editor  
Journal Content Management Department  
fax +91 44 42197753  
email [jop@wiley.com](mailto:jop@wiley.com)

For questions concerning copyright, please visit [Copyright FAQ](#)

### **2.8 OnlineOpen**

Journal of Oral Pathology & Medicine offers authors the opportunity to publish their paper OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: [https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp). Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

For questions concerning copyright, please visit [Copyright FAQ](#)

## **3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE**

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further instructions, please contact Editorial Assistant Anne-Marie Engel at [ame@dadlnet.dk](mailto:ame@dadlnet.dk)

### **3.1. Getting Started**

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>.
- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as new user.
- After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'.



Your e-mail information is very important.

- Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
- Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered as user, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre'.

### **3.2. Submitting Your Manuscript**

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
- Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
- Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

### **3.3. Manuscript Files Accepted**

Manuscripts should be uploaded as Word (.) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, acknowledgements and conflict of interest statement, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

### **3.4. Blinded Review**

All manuscripts submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* will be reviewed by two experts in the field. *Journal of Oral Pathology & Medicine* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

### **3.5. Suggest a Reviewer**

*Journal of Oral Pathology & Medicine* attempts to keep the review process as short as possible to enable rapid publication of new scientific data. In order to facilitate this process, the name and current email address of a potential international reviewer whom you consider capable of reviewing your manuscript is requested. Additionally, you may mention non-preferred reviewers as well.

### **3.6. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process**

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

### 3.7. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

### 3.8. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

### 3.9. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscripts please locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

## 4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

**Original Research Articles:** of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology.

**Review Papers:** *Journal of Oral Pathology & Medicine* commissions review papers and also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> and are subject to peer-review.

**Case Reports:** Please note that *Journal of Oral Pathology & Medicine* no longer accepts submissions of case reports.

**Brief Reports:** Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports. They should not exceed three pages.

**Letters to the Editor:** Letters, if of broad interest, are encouraged. Letters should not be confused with Brief Reports. Letters may deal with material in papers published in *Journal of Oral Pathology & Medicine* or they may raise new issues, but should have important implications.

## 5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

### 5.1. Page Charge

Articles exceeding 6 published pages are subject to a charge of USD 163 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters (excluding figures and tables).

## 5.2. Format

**Language:** The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

**Abbreviations, Symbols and Nomenclature:** Use only standard abbreviations (Vancouver System). All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Useful is Baren DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors. 4. ed. London: Royal Society of Medicine.

**Font:** When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

## 5.3. Structure

All papers submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest statement where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

**Title Page:** Should be part of the manuscript document uploaded for review and include: The title of the article, a running title of no more than 50 letters and spaces, 2-5 keywords, complete names and institution for each author, corresponding author's name, address, email address and fax number.

**Abstract:** is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings in accordance with Index Medicus (Medical Subject Headings): background, methods, results and conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

**Main Text of Original Articles:** should be divided into introduction, material and methods, results and discussion.

**Introduction:** should clearly state the purpose of the article. Give only strictly pertinent references. Exhaustive literature reviews are inappropriate.

**Materials and Methods:** must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely

available to academic researchers for their own use. This may for example include antibodies etc. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) **Clinical trials:** Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

*Journal of Oral Pathology & Medicine* encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper. .

(ii) **Experimental subjects:** Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 [www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm)) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

(iii) **Suppliers:** Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

**Results:** Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables, illustrations, or both: emphasize or summarize only important observations.

**Discussion:** Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.

**Main Text of Review Articles** comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from

everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. See also above under Ethical Guidelines.

**Conflict of Interest Statement:** All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? See also above under Ethical Guidelines.

#### 5.4. References

References should be kept to the pertinent minimum and numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which are based on the formats used in Index Medicus. Try to avoid using abstracts as references. Include manuscripts accepted, but not published; designate the abbreviated title of the journal followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted, should be cited in the text as personal communication. The references must be verified by the author(s) against the original documents. Titles should be abbreviated in accordance with the style used in Index Medicus and the Vancouver System.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here:  
[www.refman.com/support/rmstyles.asp](http://www.refman.com/support/rmstyles.asp)

Examples of the Journal's reference style:

##### (1) Standard journal article

(List all authors when 6 or less; when 7 or more, list only the first 3 and add et al.)

BUCHNER A, SCIUBBA JJ. Peripheral epithelial odontogenic tumors: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987; 63: 688-97.

HEINIC GS, GREENSPAN D, MACPHAIL LA, et al. Oral Histoplasma capsulatum infection in association with HIV infection: a case report. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 85-9.

##### (2) Corporate author

European Collaborative Study. Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet* 1992; 339: 1007-12.

##### (3) No author given

Anonymous. 'The importance of being early' [leader]. *Br Dent J* 1991; 170: 167.

##### (4) Journal supplement

MØLLER-PETERSEN J. Evaluation of diagnostic tests. Design and phases. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52: suppl. (208): 35-50.

CROSS SS, SCHOLFIELD JH, KENNEDY A, COTTON DWK. Measuring the fractal dimension of tumour borders. *J Pathol* 1992; 168: 117A (abstr).

##### (5) Journal paginated by issue

HILLAM C. Dentistry in Europe in the 1790's. *Dent Historian* 1992; 22: (May): 31-4.

**(6) Book**

PINDBORG JJ. Atlas of diseases of the oral mucosa. Copenhagen: Munksgaard, 1992: 50-66.

**(7) Chapter in a book**

VAN DER WAAL I. Salivary gland neoplasms. In: PRABHU SR, WILSON DF, DAFTARY DK, JOHNSON NW, eds. Oral diseases in the tropics. Oxford: Oxford Medical, 1992; 478-86.

**(8) Published proceedings paper**

DRINNAN AJ. Review of the literature: educational aspects of oral medicine. In: MILLARD HD, MASON DK, eds. World workshop on oral medicine. Chicago: Year Book Medical, 1989; 5-11.

**(9) Agency publication**

MUIR C, WATERHOUSE J, MACK T, POWELL J, WHELAN S. Cancer incidence in five continents: Vol. 5. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987; IARC Scientific Publications No. 88.

**(10) Dissertation or thesis**

CHUNGPANICH S. The diagnostic and prognostic potential of nucleolar organizer regions in oral epithelial dysplasia. MMedSci Thesis, University of Sheffield, 1989.

**5.5. Tables, Figures and Figure Legends**

**Tables:** should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

**Figures:** All figures should clarify the text and their number be kept to a minimum. Text on figures should be in CAPITALS. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast.

All figures and artwork must be provided in electronic format. Figure legends should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used: they should not contain any details of methods.

Submit your figures as EPS, TIFF or PDF files. Use 300 dpi resolution for photographic images and 600 dpi resolution for line art. Full details of the submission of artwork are available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

**6. AFTER ACCEPTANCE****6.1 Copyright**

A completed Copyright Transfer Agreement (CTA), found at [www.wiley.com/go/ctaaglobal](http://www.wiley.com/go/ctaaglobal) must be received by Production Editor before any manuscript can be published. Authors must send the completed original CTA by regular mail upon receiving notice of manuscript acceptance, i.e. do not send the CTA at submission.

## **6.2 Proofs**

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file.

## **6.3 Supporting Information**

If you have previously provided Supporting Information with your article, please note it will not be edited or altered from its original format during the Production process. Although a proof of your Supporting Information is not available, it will appear online when your article is published.

## **6.4 Early View**

*Journal of Oral Pathology & Medicine* is covered by Wiley-Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. Early View articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

## **6.5 Offprints**

The corresponding author will receive a free PDF offprint that can be downloaded via Author Services. Please sign up for the service if you would like to access your free article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more information.

## **6.6 Author Services**

Online production tracking through Wiley-Blackwell's Author Services Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.





### Rafaela Nogueira Moreira

Nascimento	04 de dezembro de 1981, em Viçosa, Minas Gerais, Brasil
Filiação	Mário Lúcio Moreira Laura Adelaide Nogueira Moreira
2001-2005	Graduação em Odontologia pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri- UFVJM
2006-2007	Especialização em Endodontia pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri- UFVJM
2007	Professora Convida das disciplinas de Microbiologia Bucal e Histologia Bucal pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri- UFVJM
2009	Aprovada em 1º Lugar para professora substituta da disciplina de Histologia Básica pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri- UFVJM
2011	Mestrado em Odontologia, pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia – Área de concentração em Clínica Odontológica pela Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri- UFVJM

#### Artigos publicados:

**Moreira RN**, Alcântara CE, Mota-Veloso I, Marinho SA, Ramos-Jorge ML, Oliveira-Ferreira F. Does intellectual disability affect the development of dental caries in patients with cerebral palsy? Res Dev Disabil. 2012 Sep-Oct;33(5):1503-7. doi: 10.1016/j.ridd.2012.03.026.

Dourado Mda R, Andrade PM, Ramos-Jorge ML, **Moreira RN**, Oliveira-Ferreira F. Association between executive/attentional functions and caries in children with cerebral palsy. Res Dev Disabil. 2013 Sep;34(9):2493-9. doi: 10.1016/j.ridd.2013.05.003

**Moreira RN**, et al .Primary oral melanoma: importance of early diagnosis. *Chirurgia* 2011 June; 24(3): 181-3.

**Moreira RN**, Santos CR, Lima NL, Verli FD, Marinho SA. Oral and cutaneous melanoma: similarities and differences. *J Clin Med Res.* 2010 Aug 18;2(4):155-8.doi 10.4021/jocmr416w. PMID: 21629531.

**Moreira RN**, et al. Dental trauma clinically mimicking single central incisor syndrome. *Rev.Odonto Ciênc.*[online]. 2010, vol.27, n.1, pp. 78-81. ISSN 1980-6523.



**Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**Campus JK - Rodovia MGT 367 - Km 583, 5000**  
**Alto da Jacuba, Bloco II - Sala 02**  
**CEP: 39100-000, Diamantina, MG, Brasil**  
**Fone: +55 (38) 3532 1242 /1283 /1284**  
**<http://www.ufvjm.edu.br>**

**Programa de Pós-Graduação em Odontologia - PPGOdonto**  
**Campus I - Rua da Glória, 187 - Prédio da Biblioteca, sala 12**  
**CEP: 39100-000, Diamantina, MG, Brasil**  
**Fone: +55 (38) 3532 6099**