

ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CAUSADAS PELA INDUÇÃO CONCOMITANTE DE DMBA E BEBIDAS ALCOÓLICAS DE ALTO TEOR NA CARCINOGENESE QUÍMICA BUCAL*

STUDY OF MORPHOLOGIC CHANGES CAUSED BY CONCOMITANT INDUCTION OF DMBA AND HEAVY ALCOHOLIC DRINKS IN ORAL CHEMICAL CARCINOGENESIS

Nádia Lages LIMA

Aluna do Curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal em nível de Doutorado da FOB - USP.

Luís Antônio de Assis TAVEIRA

Professor Doutor do Departamento de Estomatologia – área de Patologia Bucal da FOB - USP.

*Resumo da Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de Patologia Bucal.

Realizou-se este trabalho com o objetivo de observar o comportamento biológico, macro e microscópico, da mucosa lingual lateral de hamsters sírios dourados *Mesocricetus auratus* após contato direto com bebidas de alto teor alcoólico (cachaça e uísque) associadas ao 9,10 dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA). Sessenta animais foram divididos em três grupos experimentais: grupo 1 – DMBA + cachaça; grupo 2 – DMBA + uísque; grupo 3 – DMBA. Dez animais de cada grupo experimental foram sacrificados após 13 e 20 semanas. Os resultados mostraram que após 13 semanas ocorreu a formação de alterações displásicas em 70%, 60% e 80%, na língua dos animais dos grupos 1, 2 e 3, respectivamente. Após 13 semanas, carcinomas de células escamosas papiliforme estavam presentes em todos os grupos experimentais sendo que em 30% dos animais do grupo 1 os carcinomas eram pequenos (0,1-0,2cm); no grupo 2, 30% dos animais apresentavam carcinomas pequenos e 10% eram microinvasivos; no grupo 3 todos os carcinomas presentes eram microinvasivos (20%). Após 20 semanas, ocorreu a formação de alterações displásicas em 10%, 10% e 30% dos animais dos grupos 1, 2 e 3, respectivamente; carcinomas microinvasivos em 20% dos animais do grupo 1; carcinomas de células escamosas papiliforme tamanho pequeno em 50%, 30% e 60% dos animais dos grupos 1, 2 e 3, respectivamente; e os carcinomas de células escamosas papiliforme grandes (>0,5cm) em 20%, 60% e 10% dos animais dos grupos 1, 2 e 3 respectivamente. Assim, pode-se concluir que as bebidas de alto teor alcoólico (cachaça e uísque) tem potencial carcinogênico promotor sobre a mucosa bucal e o uísque tem potencial carcinogênico de progressão sobre a mucosa bucal.

UNITERMOS: Bebidas de alto teor alcoólico; Câncer bucal; Carcinogênese química.

INTRODUÇÃO

Não está claro se o aparecimento de câncer bucal ocorre devido ao contato direto do álcool com a mucosa ou se devido às alterações provocadas pelo álcool no fígado^{16, 18}.

No homem, dados epidemiológicos^{2,6,7,11,15,18,20} apontam a bebida alcoólica como um dos fatores atuantes na carcinogênese. Uma metodologia experimental padronizada, levando-se em consideração os vários aspectos das displasias e carcinomas induzidos em animais e daqueles desenvolvidos no homem, com suas devidas peculiaridades, faz-se de grande utilidade neste contexto para que vários questionamentos existentes possam ser discutidos com uma visão globalizada das bases epidemiológicas e experimentais apropriadas.

Apesar de muito citado e comentado, o papel do álcool e das bebidas alcoólicas merecem mais estudo para a obtenção de evidências mais claras sobre o seu papel na carcinogênese e os mecanismos envolvidos.

MATERIALE MÉTODOS

Neste experimento, foram utilizados 60 hamsters sírios dourados *Mesocricetus auratus* com peso corporal médio de 187g, com idade média de cem dias, sem diferença de distribuição quanto ao sexo.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais, com 20 espécimes cada. Esses grupos foram divididos em subgrupos de 13 semanas e de 20 semanas com dez espécimes cada. Os hamsters do grupo 1 receberam aplicações tópicas de cachaça e de DMBA na borda lateral do terço médio da língua, em dias alternados. Os animais do grupo 2 receberam aplicações tópicas de uísque e de DMBA na borda lateral do terço médio da língua, em dias alternados. O grupo 3 recebeu aplicações tópicas do carcinógeno 9, 10 dimetil, 1,2-benzantraceno (DMBA) diluído em acetona a 0,5%, também em dias alternados, sendo o grupo "controle/positivo".

As bebidas alcoólicas, cachaça e uísque, foram selecionadas dentre uma amostragem de marcas

comerciais; sendo utilizados o uísque e a cachaça que no alcoômetro Gay-Lussac, demonstraram maior teor alcoólico, sendo respectivamente 40º gl e 48º gl^{9,14}. Foram adquiridas no comércio local e mantidas em temperatura ambiente.

O carcinógeno DMBA foi adquirido na forma de pó sendo diluído em acetona a 0,5

A superfície da mucosa lingual da borda lateral era pincelada três vezes por semana, por quatro vezes consecutivas. Evitou-se o excesso de solução ou de bebida no pincel para impedir ao máximo a deglutição das mesmas. Para esses procedimentos, os hamsters não eram anestesiados.

Ao término dos prazos estipulados para este experimento, os animais foram sacrificados e as línguas foram fixadas em formalina a 10% e devidamente processadas e incluídas em parafina; os cortes foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (H.E.) para posterior análise microscópica.

RESULTADOS

Os resultados foram expressos em porcentagem, para facilitar a compreensão dos dados obtidos, conforme Figuras 1, 2 e 3.

As características da mucosa bucal da margem lateral da língua do hamsters incluem um epitélio de revestimento estratificado pavimentoso discretamente ceratinizado, com estrato granuloso mínimo, estando presentes em média 4 a 6 camadas de células e a junção epitélio-conjuntivo marcada por cristas epiteliais.

As características das displasias DMBA induzidas e observadas nos grupos 1, 2 e 3 foram descritas como a presença de uma superfície recoberta por epitélio pavimentoso estratificado hiperplásico e hiperqueratinizado, algumas vezes apresentando projeções papiliformes, com presença de mais de uma camada de células basalóides, perda de polaridade das células basais, pleomorfismo celular. Ceratinização de células isoladas formando corpos redondos e a presença de pequenos espaços no terço basal foram características observadas algumas vezes.

AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (V.N.)	PERÍODO ANIMAIS	13 SEMANAS										20 SEMANAS												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%	
	MUCOSA NORMAL (1,0)																							
HIPERPLASIA E HIPERCERATOSE	DISCRETA (2,0)																							
	MODERADA (2,5)																							
	INTENSA (3,0)																							
DISPLASIA EPITELIAL ESCAMOSA	DISCRETA (3,5)																							
	MODERADA (4,0)																							
	INTENSA (4,5)																							
	CARCINOMA MICROINVASIVO (5,0)																							
	CARCINOMA DE CELS ESCAMOSAS PAPILIFORME - P (5,5)																							
	CARCINOMA DE CELS ESCAMOSAS PAPILIFORME - M (6,0)																							
	CARCINOMA DE CELS ESCAMOSAS PAPILIFORME - G (6,5)																							
	PORCENTAGEM TOTAL																							

FIGURA 1 - (Grupo 1) Aspectos morfológicos e respectivos escores observados no epitélio lingual lateral submetido à aplicação de cachaça e DMBA três vezes por semana. P=pequeno, M=médio e G=grande

AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (V.N.)	PERÍODO ANIMAIS	13 SEMANAS										20 SEMANAS											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%
	MUCOSA NORMAL (1,0)																						
HIPERPLASIA E HIPERCERATOSE	DISCRETA (2,0)																						
	MODERADA (2,5)																						
	INTENSA (3,0)																						
DISPLASIA EPITELIAL ESCAMOSA	DISCRETA (3,5)											10%											
	MODERADA (4,0)											50%											10%
	INTENSA (4,5)																						
	CARCINOMA MICROINVASIVO (5,0)											10%											
	CARCINOMA DE CELS ESCAMOSAS PAPILIFORME - P (5,5)											30%											30%
	CARCINOMA DE CELS ESCAMOSAS PAPILIFORME - M (6,0)																						
	CARCINOMA DE CELS ESCAMOSAS PAPILIFORME - G (6,5)																						60%
	PORCENTAGEM TOTAL											100											100

FIGURA 2 - (Grupo 2) - Aspectos morfológicos e respectivos escores observados no epitélio lingual lateral submetido à aplicação de uísque e DMBA três vezes por semana. P=pequeno, M=médio e G=grande

AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA (V.N.)	PERÍODO ANIMAIS	13 SEMANAS										20 SEMANAS											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	%
	MUCOSA NORMAL (1,0)																						
HIPERPLASIA E HIPERCERATOSE	DISCRETA (2,0)																						
	MODERADA (2,5)																						
	INTENSA (3,0)																						
DISPLASIA EPITELIAL ESCAMOSA	DISCRETA (3,5)											30%											20%
	MODERADA (4,0)											40%											
	INTENSA (4,5)											10%											10%
	CARCINOMA MICROINVASIVO (5,0)											20%											
	CARCINOMA DE CELS ESCAMOSAS PAPILIFORME - P (5,5)																						60%
	CARCINOMA DE CELS ESCAMOSAS PAPILIFORME - M (6,0)																						
	CARCINOMA DE CELS ESCAMOSAS PAPILIFORME - G (6,5)																						10%
	PORCENTAGEM TOTAL											100											100

FIGURA 3 - (Grupo 3) - Aspectos morfológicos e respectivos escores observados no epitélio lingual lateral submetido à aplicação de DMBA três vezes por semana. P=pequeno, M=médio e G=grande

Os carcinomas microinvasivos apresentavam superfície recoberta por epitélio pavimentoso estratificado ceratinizado, hiperplásico, com desorganização das camadas epiteliais. Presença de hiperchromatismo nuclear, pleomorfismo celular e nuclear e células neoplásicas atípicas invadindo a lâmina própria.

As lesões de carcinoma de células escamosas papiliforme (Figuras 4 e 5) observadas nos grupos 1, 2 e 3 apresentam características epiteliais peculiares e descritas como segue: superfície recoberta por epitélio pavimentoso estratificado hiperkeratinizado hiperplásico com áreas onde se observa desorganização das camadas

epiteliais, perda de polaridade das células basais com flutuação das células espinhosas, hiperchromatismo nuclear, pleomorfismo celular, mitoses atípicas e invasão do conjuntivo subjacente; ceratinização de células individuais e de grupos de células é visto com frequência. No geral, grande parte da lesão semelhante à lesão hiperplásica do tipo papiliforme; septos de conjuntivo projetam-se em direção ao epitélio, sendo revestidos pelo mesmo e caracterizando as projeções papiliformes.



FIGURA 4 – Aspecto clínico do carcinoma de células escamosas papiliforme grande



FIGURA 5 – Aspectos microscópicos de carcinoma de células escamosas papiliforme grande. Destaca-se o tamanho da lesão em relação à língua. (Aumento original = 1x, H.E.)

Massas epiteliais com centros de ceratina, bem diferenciadas, estendem-se para a submucosa com margens rombudas. Massas epiteliais bem delimitadas por camadas de células basais e tendo no centro células da camada espinhosa, também proliferam e adentram as estruturas. Células da camada espinhosa são vistas adentrando o tecido conjuntivo.

Os tamanhos dos carcinomas de células escamosas papiliformes para serem considerados de tamanho pequeno deveriam atingir até no máximo 0,2cm de diâmetro. Os de tamanho médio atingir no máximo até 0,4cm de diâmetro. Os de tamanho grande a partir de 0,5cm de diâmetro. As lesões do Grupo 1 de tamanho pequeno tinham em média 0,1 cm de diâmetro e as lesões de tamanho grande de 0,5 a 0,7cm de diâmetro. As lesões do Grupo 2 de tamanho pequeno tinham em média 0,1 a 0,2cm de diâmetro e as lesões de tamanho grande de 0,5 a 0,8cm de diâmetro, e as lesões do Grupo 3 de tamanho pequeno tinham em média 0,1cm de diâmetro e as lesões de tamanho grande de 0,5cm de diâmetro.

DISCUSSÃO

O relacionamento álcool/câncer evidenciado em estudos epidemiológicos^{2,6,7,11,15,18,20}, demonstra a necessidade de uma reflexão sobre as hipóteses existentes quanto ao mecanismo de atuação da bebida alcoólica na mucosa bucal^{1,8,12}, principalmente em relação a uma atuação direta bebida alcoólica/mucosa bucal/carcinogênese, e a viabilidade de um correlacionamento entre as características próprias das displasias e carcinomas experimentalmente induzidos com as características das displasias e carcinomas desenvolvidos no homem, conduziu-nos ao planejamento deste trabalho.

Ao considerar-se as peculiaridades da carcinogênese química bucal experimental, as diferenças genéticas existentes entre as espécies, a influência de fatores ambientais e de fatores psicossociais na carcinogênese humana, a influência da vulnerabilidade dos tecidos e da resposta imunológica, ressaltamos a validade da extrapolação destes estudos para o homem.

Na carcinogênese, três fenômenos biológicos são fundamentais: a iniciação, a promoção e a progressão⁴. A iniciação seria demonstrada pelo encurtamento do período latente da carcinogênese em um tratamento subsequente com um carcinógeno. A promoção representada por uma exacerbação da carcinogênese por um agente não carcinógeno, ocorrendo isso quando o agente é aplicado concomitantemente com um carcinógeno que está atuando sob ótimas condições. A progressão representada pelo estágio de franco desenvolvimento e invasibilidade do carcinoma⁹.

O composto 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) comporta-se experimentalmente como um agente iniciador da carcinogênese. O álcool no homem atua de acordo com estudos experimentais¹⁵ e epidemiológicos como um agente promotor^{2,6,7,11,15,18,20}, e neste estudo

observamos que na bebida alcoólica, como a cachaça e o uísque, associadas ao DMBA houve um efeito promotor. Ainda neste estudo pode-se observar um extraordinário fenômeno de progressão das lesões no grupo experimental 2 (20 semanas) onde se aplicava de modo concomitante DMBA e uísque três vezes por semana, provavelmente porque no uísque existam outras substâncias que colaboram para o franco desenvolvimento dos carcinomas sobrepondo o efeito promotor exercido pelo álcool.

Na carcinogênese química experimental, o carcinoma da mucosa bucal é freqüentemente precedido por lesão hipercheratótica e displásica comparável a leucoplasia humana^{10,16}. De acordo com a aparência clínica, leucoplasias podem ser classificadas como homogêneas e não homogêneas; a última constitui quase 10% de todas as leucoplasias; a leucoplasia homogênea pode ser estabelecida em todas as regiões da mucosa bucal; a lesão é branca com superfície lisa, corrugada, pregueada, ou semelhante a pedra-pomes; as leucoplasias não homogêneas podem também ser estabelecidas em qualquer superfície da mucosa bucal; elas são predominantemente brancas com características verrucóides, nodulares, ulceradas ou eritematosas¹³; sendo assim, podemos comparar a leucoplasia experimental a leucoplasia humana do tipo homogênea ou não homogênea.

As lesões exofíticas papiliformes em modelos experimentais DMBA/induzidos seriam análogos aos carcinomas de células escamosas papiliformes em humanos, sendo este um carcinoma de células escamosas invasivo que tem como componente um crescimento exofítico papiliforme e pode clinicamente lembrar o carcinoma verrucoso; seu comportamento é mais agressivo que o carcinoma verrucoso.

Os carcinomas DMBA-induzidos, em geral, são bem diferenciados pois, apesar da atipia celular traduzida pelo pleomorfismo e hiperchromatismo exuberantes, bem como pelas mitoses freqüentes, a disceratose e as pérolas córneas são abundantes. A organização tecidual, a relação intercelular e o modelo de invasividade são condizentes com uma diferenciação celular ainda presente⁴.

A relação entre a expressão do gene P53 que em níveis normais atua como um gene supressor de tumores e a história do consumo de tabaco e de bebida, em 48 pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço foi descrita por meio de uma análise regressiva logística. Pacientes consumidores de bebida e fumantes intensivos tinham muita probabilidade de expressar o P53, indicando um efeito sinérgico, e danificação do P53 a medida do aumento da sua expressão (FIELD, SPANDIDOS, STELL⁵, 1992); o que representaria uma não supressão dos carcinomas favorecendo ao seu franco desenvolvimento.

Os estudos de KETCHAM, WEXLER, MANTEL⁸, em 1963, não demonstraram a atuação do álcool como um agente promotor da carcinogênese química provavelmente devido ao fato de que a atuação do álcool

não se fazia de modo direto na região do desenvolvimento do carcinoma pois, este se desenvolvia na pata traseira do animal e o álcool a 20% era ingerido junto a água de consumo.

MACCOY; WYNDER¹², em 1979, evidenciaram a associação epidemiológica do álcool como um agente promotor, levantaram possíveis mecanismos que pudessem explicar essa evidência considerando apenas o fator álcool das bebidas, não considerando as demais substâncias presentes nas mesmas; e por este fato levantaram hipóteses como a desnutrição causada pelo álcool, álcool induzindo a um decréscimo de metabolismo no fígado, dentre outras.

Dentre as hipóteses levantadas por BLOT¹, em 1992, a respeito de possíveis mecanismos por meio dos quais a bebida alcoólica pode causar câncer, merece especial atenção a seguinte: componentes presentes e outros contaminantes possivelmente contidos na bebida alcoólica como compostos N-nitroso (algumas cervejas), micotoxinas (alguns vinhos e cerveja de milho da África do Sul), “urethan” (níveis aumentados em certas frutas), tanino (vinhos), arsênio inorgânico, outros pesticidas residuais e produtos da filtração de asbestos; aditivos da bebida alcoólica como agentes preservativos e aromatizantes, produtos naturais como aldeídos, acromeleinas, fenóis e cetonas podem influenciar o processo carcinogênico.

Outro tipo de substâncias detectadas em vários alimentos e, em especial, nas bebidas alcoólicas são as nitrosaminas voláteis carcinogênicas²¹.

Discordamos das conclusões do trabalho de TRIEGER; TAYLOR; WEISBERGER¹⁹, em 1959, de que se pode especular que o efeito local do álcool sobre a mucosa bucal pode ser de menor importância e secundário a alteração generalizada da desnutrição da mucosa resultante de disfunção hepática pois, no presente trabalho ficou demonstrada a atuação direta da bebida de teor alcoólico elevado sobre a mucosa bucal.

Concordamos com os resultados do trabalho de ELZAY³, em 1966, que sugere um efeito promotor do álcool e ao reconhecer que o desenvolvimento de carcinomas em bolsas de bochecha de hamsters onde se aplicava apenas o álcool se devia a um falso resultado positivo, pois as mesmas poderiam ter sido contaminadas devido à aplicação de DMBA nas bolsas do lado oposto. LIMA⁹, em 1997, demonstrou que a bebida de alto teor alcoólico não atua como um agente iniciador da carcinogênese química bucal. No presente trabalho, concluímos que a bebida de alto teor alcoólico atua como um agente promotor da carcinogênese e, em especial, o uísque atua como um agente de progressão dos carcinomas bucais.

O uísque contém em adição ao álcool uma ampla variedade de agentes incluindo hidrocarbonetos policíclicos alcalóides e aromáticos⁸, devendo-se provavelmente, a este fato, os nossos resultados, pois verificamos um extraordinário fenômeno de progressão das lesões no grupo experimental 2 (20 semanas), onde

se aplicava de modo concomitante DMBA e uísque três vezes por semana.

Nossos resultados demonstraram também que, no período experimental de 13 semanas e dentre os carcinomas microinvasivos e os carcinomas de células escamosas papiliforme tamanho pequeno, o grupo 1 (cachaça + DMBA) apresentou três lesões enquanto no grupo 3 (controle – positivo) foram observadas duas lesões e no grupo 2 (uísque + DMBA) quatro lesões dos dez animais estudados; no período de 20 semanas foi observado que em relação ao carcinoma de células escamosas papiliforme de tamanho grande o grupo 1 apresentou duas lesões, o grupo 3 apresentou uma lesão e no grupo 2 foram observadas seis lesões dos dez casos analisados. Sendo assim, consideramos que além do álcool contido nas bebidas analisadas outras substâncias, em sua composição, colaboram para os efeitos promotor e de progressão observados, ocorrendo um efeito promotor em relação aos grupos 1 e 2 e um efeito de progressão em relação ao grupo 2.

CONCLUSÕES

Pode-se concluir que: as bebidas alcoólicas de alto teor (cachaça e uísque) têm potencial carcinogênico promotor sobre a mucosa bucal; o uísque têm potencial carcinogênico de progressão sobre a mucosa bucal; morfológicamente, à microscopia de luz, é possível detectar e comparar as alterações na carcinogênese bucal quimicamente induzida após 13 semanas.

ABSTRACT

The aim of this study was to verify the macro and microscopic changes caused by topical application of heavy alcoholic drinks (“cachaça” and whisky) in the lateral tongue of the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*) submitted to 9,10 dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA)-induced oral cancer. Sixty animals were distributed in three experimental groups: GROUP 1 – DMBA + “cachaça”; GROUP 2 – DMBA + whisky and GROUP 3 – DMBA. Ten animals of each experimental group were sacrificed after 13 and 20 weeks. The results showed that, after 13 weeks, occur dysplasia formation in 70%, 60% and 80% the animals of the groups 1, 2 and 3, respectively. After 13 weeks, all animals developed papillary squamous cell carcinomas in the tongue, also, it was observed that in the Group 1 30% of the animals the carcinomas were small (0,1-0,2cm); in the Group 2, 30% of the animals presented small carcinomas (30%) and 10% microinvasive carcinomas; in the Group 3 the carcinomas observed in 20% of the animals were microinvasive. After 20 weeks, occur dysplasia formation in 10%, 10% and 30% in the animals of the groups 1, 2 and 3, respectively; microinvasive carcinomas in 20% the animals of the group 1; small papillary squamous

cell carcinomas in 50%, 30% and 60% the animals of the groups 1, 2 and 3, respectively; the carcinomas were large (>0,5cm) in 20%, 60% and 10% of the 1, 2 and 3 groups, respectively. Following the results obtained from this study it was concluded that drinks with high alcoholic volume ("cachaça" and whisky) have potential for promotion of oral carcinogenesis and that whisky also potential for progression of oral cancer.

Uniterms: Heavy alcoholis drinks; Oral cancer; Chemical carcinogenesis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-BLOT, W.J. Alcohol and cancer. **Cancer Res.**, v.52, n.1, p.2119s-23s, Apr.1992
- 2-CHOI, S.Y.; KAHYO, H. Effect of cigarette smoking and alcohol consumption in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. **Int. J. Epidemiol.**, v.20, n.4, p.878-85, 1991.
- 3-ELZAY, R.P. Local effect of alcohol in combination with DMBA on hamster cheek pouch. **J. dent. Res.**, v.45, n.6, p.1789-95, Nov./Dec. 1966.
- 4-FASSONI, A.A. **Carcinogênese bucal química DMBA-induzida: estudo metodológico em hamsters sírios dourados.** Bauru, 1992. 87p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.
- 5-FIELD, J.K.; SPANDIDOS, D.A.; STELL, P.M. Overexpression of p53 gene in head-and-neck cancer, linked with heavy smoking and drinking. **Lancet**, v.339, p.502-3, Feb. 1992.
- 6-GROSSARTH-MATICEK, R.; EYSENCK, H.J. Personality, smoking, and alcohol as synergistic risk factors for cancer of the mouth and pharynx. **Psychol. Rep.**, p.1024-6, Nov. 1990.
- 7-KELLER, A.Z. Cirrhosis of the liver, alcoholism and heavy smoking associated with cancer of the mouth and pharynx. **Cancer**, v.20, n.6,p.1015-22, June 1967.
- 8-KETCHAM, A.S.; WEXLER, H.; MANTEL, N. Effects of alcohol in mouse neoplasia. **Cancer Res.**, v.23, p.667-70, June 1963.
- 9-LIMA,N.L. **Estudo das alterações morfológicas na carcinogênese química bucal comparando-se a indução pelo DMBA e bebidas alcoólicas de alto teor.** Diamantina, 1997. 102p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade Federal de Odontologia de Diamantina.
- 10-MAREFAT, P.; SHKLAR, G. Experimental production of lingual leukoplakia and carcinoma. **Oral Surg.**, v.44, n.4, p.578-86, Oct. 1977.
- 11-MASHBERG, A. et al. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. **Cancer**, v.72, n.4, p.1369-75, Aug. 1993.
- 12-MCCOY, G.D.; WYNDER, E.L. Etiological and preventive implications in alcohol carcinogenesis. **Cancer Res.**, v.39, p.2844-50, July 1979.
- 13-PINDBORG, J.J. et al. **World Health Organization – International Histological Classification of Tumours – Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa**, 2. ed. New York, Springer, 1997.
- 14-PIÑERA, K.; NOGUEIRA, A C. A; CONSOLARO, A determinação do teor alcoólico de anti-sépticos bucais e carcinogênese bucal química. **Rev. Bras. Ciênc. Estomat.**, v.1, n.1, p.13-7, 1996.
- 15-ROTHMAN, K.; KELLER, A. The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. **J. Chron Dis.**, v.25, p.711-6, Mar. 1972.
- 16-SHKLAR, G. Experimental oral pathology in the syrian hamsters. **Prog. Exp. Tumor res.**, v.16, p.518-38, 1972.
- 17-SILVERMAN JUNIOR, S. Current status of oral cancer and premalignant lesions. **Alpha Omegan**, v.54, p.143-55, Dec. 1969.
- 18-TALAMINI, R. et al. The role of alcohol in oral and pharyngeal cancer in non-smokers, and of tobacco in non-drinkers. **Int. J. Cancer**. v.46, p.391-3, May 1990.
- 19-TRIEGER, N., TAYLOR, G.W., WEISBERGER,D. The significance of liver dysfunction in mouth cancer. **Surg. Gynec. Obstet.**, p.230-4, Feb. 1959.
- 20-TUYNS, A.J. Alcohol and cancer. **Proc. Nutr. Soc.**,v.49,p.145-51, 1990.
- 21-WALKER, E.A. et al. Intake of volatile nitrosamines from consumption of alcohols. **JNCI**, v.63, n.4, p.947-51, Oct. 1979.