



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Elias Naim Kassis

**Efeitos do Etanol Sobre a Mucosa e Osso
Palatinos do Rato Durante a Lactação.
Estudo Histopatológico e Histométrico
Experimental.**

**São José do Rio Preto
2011**

Elias Naim Kassis

**Efeitos do Etanol Sobre a Mucosa e Osso
Palatinos do Rato Durante a Lactação.
Estudo Histopatológico e Histométrico
Experimental.**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

Co-Orientador: Ruberval Armando Lopes

São José do Rio Preto
2011

Kassis, Elias Naim

Efeitos do Etanol Sobre a Mucosa e Osso Palatinos do Rato Durante a Lactação. Estudo Histopatológico e Histométrico Experimental. / Elias Naim Kassis

São José do Rio Preto, 2011

90 p.;

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Azoubel

Co-Orientador: Ruberval Armando Lopes

1. Alcoolismo e lactação; 2. Epitélio palatino; 3. Osso palatino; 4. Cariometria e estereologia; 5. Rato.

Elias Naim Kassis

**Efeitos do Etanol Sobre a Mucosa e Osso
Palatinos do Rato Durante a Lactação.
Estudo Histopatológico e Histométrico
Experimental.**

Banca Examinadora

Tese para Obtenção do Grau de Doutor

Presidente e Orientador: **Prof. Dr. Reinaldo Azoubel**

2º Examinador: **Prof. Dr. Eudes Quintino de Oliveira Junior**

3º Examinador: **Prof. Dr. Eliane Cristina Vicente**

4º Examinador: **Prof. Dr. Fernando Batigália**

5º Examinador: **Prof. Dr. Alex Tadeu Martins**

Suplentes: **Prof. Dr. Reinaldo Missaka**

Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo

São José do Rio Preto, 11/02/2011

SUMÁRIO

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	x
Resumo.....	xi
Abstract.....	xiii
1. Introdução	01
1.1. Revisão da Literatura	16
1.1.1. Lactação	16
1.1.2. Álcool e Lactação	16
1.2. Objetivos	20
2. Material e Métodos	21
2.1. Animais	22
2.2. Tratamento	22
2.3. Técnica de Dissecção e Técnica Histológica	22
2.4. Técnica Morfométrica.....	24
2.4.1. Cariometria.....	24
2.4.2. Volume, Área e Perímetro dos Osteócitos.....	25
2.5. Técnicas Estereológicas	25
2.5.1. Epitélio de Revestimento do Palato.....	26

2.6. Técnica Estatística	30
3. Resultados	32
3.1. Morfológicos	33
3.2. Morfométricos.....	38
3.2.1. Cariometria.....	38
3.2.1.1. Epitélio de Revestimento do Palato	38
3.2.1.2. Osso Palatino	46
3.3. Estereológicos.....	49
3.3.1. Epitélio Palatino.....	49
3.3.2. Osso Palatino	55
4. Discussão.....	58
5. Conclusões	65
6. Referências Bibliográficas.....	67

Ao meu pai Naim

O seu exemplo vive em mim.

Saudades

À minha mãe Salma

Sem o seu amor, nada disso teria

sido possível

À minha esposa Telma

Saudade, palavra triste quando

se perde um grande amor

À minha filha Manuella

Pelas horas ausentes, pelo beijo

não dado

Agradecimentos

- ✓ Ao meu orientador **Prof. Dr. Reinaldo Azoubel, Professor Titular Emérito da Famerp.**

Amado Professor - “Aprendi com você, que a ciência sem amor, nada constrói.”

Muito Obrigado!

- ✓ Agradeço ao meu Co-Orientador **Prof. Dr. Ruberval Armando Lopes – Professor Titular Emérito do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FORP-USP).**

“Querido Professor. Agradeço-lhe por toda dedicação que teve para comigo. Feliz daquele tem o privilégio de conhecê-lo e pode desfrutar de seus ensinamentos. Professor na essência e na alma.”

Muito obrigado!

- ✓ **Ao Prof. Dr. Miguel Angel Sala – Professor Titular do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FORP-USP).**

“Pela ajuda na tabulação dos dados, aplicação das fórmulas e estatísticas.”

Meu agradecimento.

- ✓ Ao **Professor Domingo Marcolino Braile**.
“Pela acolhida sincera e conselhos que nortearam esse trabalho. Algumas pessoas passam como um meteoro em nossas vidas e, simplesmente, nos marcam para sempre.” Obrigado Dr. Braile!

- ✓ Ao Dr. **Alex Tadeu Martins**.
“Pela ajuda na leitura e interpretação dos resultados histológicos e cariométricos.”

- ✓ À **Dra. Viviane Curi**.
“Companheira da longa estrada.”

- ✓ Ao Chanceler da Unorp – **Dr. Augusto Cezar Casseb** e ao Reitor **Dr. Eudes Quintino de Oliveira Júnior**, meus agradecimentos pelo apoio e incentivos constantes.

- ✓ Aos funcionários da Pós-Graduação da FAMERP - **José Antonio Silistino, Fabiana Cristina Godoy, Guilherme Martins, Luís Henrique Oliveira Ferreira e Rosimere Cleide Souza Desidério** pela dedicação, carinho e paciência.

- ✓ Aos funcionários do **Biotério e Laboratório da Famerp**, pelo compromisso e cuidados constantes.

✓ À **Famerp**

“Por ter tornado esse trabalho possível.

Fica a certeza de que espalharei as sementes aqui colhidas,
para fecundarem sementeiras e árvores frondosas.”

Minha eterna gratidão!

✓ E a **todos** que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização
deste trabalho.

VIDA

“Já perdoei erros quase imperdoáveis,
tentei substituir pessoas insubstituíveis
e esquecer pessoas inesquecíveis”.

Já fiz coisas por impulso,
Já me decepcionei com pessoas
quando nunca pensei me decepcionar,
mas também decepcionei alguém

Já abracei pra proteger,
Já dei risada quando não podia,

Já fiz amigos eternos,
já amei e fui amado,

mas também

já fui rejeitado

Já fui amado e não soube amar.

Já gritei e pulei
de tanta felicidade,

já vivi de amor
e fiz juras eternas,
mas "quebrei a cara"
muitas vezes!

Já chorei ouvindo música e vendo fotos,

Já liguei só pra escutar uma voz,

Já me apaixonei por um sorriso,

Já pensei que fosse morrer de tanta saudade

e...

...tive medo de perder alguém especial
(e acabei perdendo)! Mas sobrevivi!

E ainda vivo!

Não passo pela vida...

e você também não deveria passar. Viva!!!

Bom mesmo é ir a luta com determinação,

abraçar a vida e viver com paixão,

perder com classe e vencer com ousadia,
porque o mundo pertence a quem se atreve

e

A VIDA É MUITO
para ser insignificante"

Charles Chaplin

Lista de Figuras

-
- Figura 1. Desenho da face ventral do crânio mostrando os pontos de referência para os três níveis para os cortes nasais..... 23
- Figura 2. Representação gráfica da grade idealizada por MERZ (1967). 26
- Figura 3. Aspecto histológico do palato de rato controle. Notar as camadas epiteliais e lâmina própria vascularizada. HE (200x).. 35
- Figura 4. Aspecto histológico do palato de rato intoxicado pelo etanol, durante a lactação. Notar epitélio delgado e lâmina própria edemaciada. HE (200x)..... 35
- Figura 5. Aspecto histológico do osso palatino de rato controle. Notar trabéculas ósseas e nodular hematopoiética. HE (50x)..... 36
- Figura 6. Aspecto histológico do osso palatino de rato controle tratado com etanol, durante a lactação. Notar trabéculas mais delicadas, e medula hematopoiética escassa repletas de células adiposas. HE (50x)..... 36
- Figura 7. Aspecto histológico do osso palatino de rato controle tratado com etanol, durante a lactação. Notar trabéculas ósseas e tecido nodular. HE (450x)..... 37
- Figura 8. Aspecto histológico do osso palatino de rato controle tratado com etanol, durante a lactação. Notar trabéculas ósseas delicadas, pouco calcificadas e medula hematopoiética escassa e com tecido gorduroso mais abundante. HE (450x)... 37

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Medidas dos pesos corporais (em gramas) dos filhotes controles e tratados pelo etanol. Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.....	34
Tabela 2.	Valores cariométricos médios para diâmetros (μm) maior, menor e médio, e relação diâmetro maior / diâmetro menor dos núcleos das células da camada basal do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicado pelo etanol (T). Teste de Wincoxon – Mann-Whitney.....	40
Tabela 3.	Valores cariométricos médios para volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação volume/área dos núcleos das células da camada basal do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicados pelo etanol (T). Teste de Wincoxon – Mann-Whitney	41
Tabela 4.	Valores cariométricos médios para excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos das células da camada basal do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicado pelo etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney...	42
Tabela 5.	Valores cariométricos médios para diâmetros (μm), maior, menor e médio, e relação diâmetro maior / diâmetro menor dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicado pelo etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.....	43
Tabela 6.	Valores cariométricos médios para volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação volume / área dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicado pelo etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.....	44

- Tabela 7. Valores cariométricos médios para excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicado pelo etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney... 45
- Tabela 8. Valores histométricos médios dos osteócitos do osso palatino de ratos controles (C) e tratados com etanol (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney..... 47
- Tabela 9. Valores histométricos médios do volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação V/A dos osteócitos do osso palatino de ratos controles (C) e tratados com etanol (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney..... 48
- Tabela 10. Valores estereológicos médios para os volumes citoplasmáticos (μm^3) e celular (μm^3), relação núcleo/citoplasma, espessura (μm) e densidade numérica celular ($\times 10^6$) da camada basal do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicados pelo etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney..... 52
- Tabela 11. Valores estereológicos médios para os volumes citoplasmáticos (μm^3) e celular (μm^3), relação núcleo/citoplasma, espessura (μm) e densidade numérica celular ($\times 10^6$) da camada espinhosa do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicados pelo etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney. 53
- Tabela 12. Valores estereológicos médios da densidade de superfície (mm^2/mm^3), da espessura total do epitélio (μm), da espessura de ceratina (μm), da relação superfície externa e camada basal e densidade numérica ($\text{n}^\circ/\text{mm}^3$) do epitélio total do palato de ratos controles (C) e intoxicados com etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney..... 54

- Tabela 13. Valores percentuais (%) médios da densidade de volume das trabéculas ósseas calcificadas, osteócitos, medula e perióstio do osso palatino de ratos controles (C) e tratados com etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney..... 56
- Tabela 14. Valores estereológicos médios do número de osteócitos/mm³ do osso palatino de ratos controles (C) e tratados com etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney..... 57

Lista de Abreviaturas e Símbolos

A	-	Área
D	-	Diâmetro maior
d	-	Diâmetro menor
E	-	Excentricidade
Ee	-	Espessura das camadas epiteliais
F	-	Coefficiente de forma
V	-	Volume
M	-	diâmetro geométrico médio
N / C	-	núcleo/citoplasma
$\frac{P}{A^{1/2}}$	-	Índice de contorno
P	-	Perímetro
SI / Sb	-	Relação Superfície Livre/Camada Basal
T	-	espessura do corte
Vct	-	Volume citoplasmático
Vrn	-	fração volumétrica
Vvc	-	fração volumétrica dos núcleos

Introdução: A ingestão materna de etanol durante a lactação altera a composição do leite, resulta no aparecimento do etanol e acetaldeído no leite, e exacerba os efeitos do etanol nos filhotes da rata. **Objetivo:** Este trabalho teve o objetivo de estudar os efeitos do etanol, ao epitélio palatino e osso palatino de filhotes lactantes em 21 dias de vida pós-natal, administrados nas ratas-mães durante a lactação. **Materiais e Métodos:** Para tal, foram utilizadas ratas que receberam etanol a 20% no bebedouro ad libitum durante os 21 dias de lactação. Os animais controles receberam um volume similar de água sem álcool. Os filhotes foram sacrificados com sobre dosagem anestésica no 21º dia. As cabeças foram separadas, fixadas em solução fixadora de álcool 80%-85ml, formalina- 10 ml e ácido acético- 5ml, a região palatina foi seccionada seriadamente em planos frontais, ao nível dos molares, e os cortes de 6 micrometros foram tratados com hematoxilina-eosina . Os parâmetros nucleares do epitélio palatino foram estimados, assim como os volumes citoplasmáticos e celulares, relação núcleo/citoplasma, densidades numérica e superficial, e espessura epitelial. O peso corporal médio do filhote foi de 34,86 g no grupo controle e 20,20 g no tratado. Histologicamente, o epitélio palatino mostrou-se mais adelgado, constituído de células abundantes e menores com núcleos maiores. O osso palatino mostrou trabéculas mais delicadas e menos calcificadas e com osteócitos de menor tamanho. **Conclusões:** Neste experimento, o etanol, induziu no quadro de hipotrofia epitelial e osso palatino mais delicado e pouco calcificado, indicando uma ação direta nas células e

trabéculas do palato, além de retardar o desenvolvimento de filhotes intoxicados.

Palavra-Chave: 1. Alcoolismo e lactação; 2. Epitélio palatino; 3. Osso palatino; 4. Cariometria e estereologia; 5. Rato.

Introduction: The ingestion of alcohol by a mother during lactation changes the composition of the milk, resulting in the origin of ethanol and acetaldehyde in the milk, and turns more severe the effects of the ethanol in infant rats. **Objective:** This work aimed to study the effects of ethanol at the palatine bone and palatine epithelium of young infants in 21 days of postnatal life, administered to the experimental rats during lactation. **Materials and Methods:** The experimental rats received ethanol at 20% in the drinking fountain *ad libitum* during those 21 day of nursing. Another group of animals received an amount of water similar to that group without ethanol. The infant rats were put to death with an extra dose of anesthesia in their 21 days of life. Their heads were separated from their body, put in 85mls of a 80% alcohol solution, 10 ml of formalin and 5ml of acetic acid, the palate area was cut in serial sections by frontal plans, in the same level were the molar are located, the cuts were about 6 micrometers and were treated with hematoxylin-eosin. The nuclear parameters of the palate epithelium, the cytoplasmatic volume and cellular, the relation nucleon/cytoplasm, numerical density and superficial, the thickness of the epithelium were all estimate. The average body weight of the infant rats in the ethanol group was 20,20 g and the other group average weight was 34,86gr. Histologically, the palate epithelium was thinner and it had more numbers of smaller cells with a bigger nucleon. The palate bone had more delicate and less trabeculo calcificated, and smaller osteocyte. **Conclusion:** In this experiment, the ethanol induced a epithelial hypotrophy condition and

palate bone more delicate and less calcificated, showing a direct affect in the cells and trabeculo palate and also the poor development of the intoxicated infant rats.

Keywords: 1. Alcoholism and lactation; 2. Palate epithelium; 3. palate bone; 4. Cariometry and stereology; 5. Rats.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O alcoolismo é um dos mais sérios problemas de saúde existentes. É uma doença incurável, de determinação fatal e progressiva até mesmo em períodos de abstinência, entretanto, tem tratamento. Afeta a saúde física, o bem estar emocional e o comportamento do indivíduo. Segundo estatísticas americanas, o alcoolismo atinge 14% de sua população.

No Brasil, estima-se que entre 10 a 20% da população sofra deste mal. Além de estar associado à desagregação familiar, as perdas materiais e ao desequilíbrio emocional, o álcool é responsável por 60% dos acidentes de trânsito nas cidades brasileiras e aparece em 70% dos laudos cadavéricos das mortes e crimes violentos. Atinge jovens, adultos jovens, adultos, idosos, gestantes e lactantes de todos os lugares.

O álcool é a substância psicoativa mais comum do planeta e a preferida por 68,7% dos brasileiros, a droga lícita que mais mata no Brasil.

O alcoolismo é um problema de Saúde Coletiva, envolvendo milhares de homens e mulheres. O álcool é classificado como um depressor do sistema nervoso central além de ser apontado como a porta de entrada para outras drogas.

Como a pessoa desenvolve alcoolismo? Um indivíduo pode tornar-se alcoolista devido a um conjunto de fatores, incluindo predisposição genética, estrutura psíquica, influências familiares e culturais. Pesquisas apontam que, aproximadamente, dez em cada cem pessoas nascem com essa

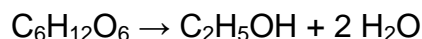
predisposição, mas só desenvolverão esta doença se entrarem em contato com o álcool. significativo.

O alcoolismo geralmente está associado a outras condições psiquiátricas como transtornos de personalidade, depressão, transtorno afetivo bipolar (antiga psicose maníaco depressiva), transtornos de ansiedade e suicídio.

O etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), comercialmente conhecido como álcool etílico, é uma substância orgânica obtida da fermentação de açúcares, hidratação do etileno (C_2H_4) ou redução do aldeído acético, oficialmente conhecido como etanol (CH_3CHO).

É encontrado em bebidas como cervejas, vinhos e aguardentes, bem como na indústria farmacêutica e indústria de perfumarias.

Sua principal obtenção se dá pela fermentação alcoólica de açúcares, como a glicose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), pelo microorganismo *Saccharomyces Cerevisae*, em reação representada por:



No Brasil, o etanol é também utilizado como combustível de motores a explosão.

O etanol é o mais comum dos alcoóis, podendo ser encontrado nas formas anidro ou hidratado.

Na forma anidro, é bastante caracterizado pelo teor alcoólico mínimo de 99,3° GL (INPM), sendo composto exclusivamente de moléculas alcoólicas de etanol. É utilizado como combustível (misturado à gasolina comum) e como matéria prima na indústria de tintas, vernizes e solventes.

O etanol hidratado é uma mistura hidroalcoólica com teor alcoólico de 92,6°GL (INPM), composto por etanol e água. É utilizado na indústria farmacêutica, álcoolquímica e de bebidas, combustível para veículos automotores e produtos de limpeza, tendo ainda uma grande quantidade de aplicações industriais e comerciais.

Em nosso organismo, assim que absorvido, 20% vai para o estômago e 80% para o intestino delgado, sendo transportado para todo o organismo por difusão simples do sangue nos tecidos.

O etanol é absorvido imediatamente no trato gastrointestinal, circula rapidamente e é distribuído uniformemente pelo corpo.⁽¹⁾ Depois disso, 80-90% do etanol absorvido é rapidamente oxidado em acetaldeído e acetato por enzimas no fígado, tais como álcool de hidrogenase e acetaldeído de hidrogenase.^(2,3) Etanol, ou seus metabólitos, podem aumentar acentuadamente os radicais livres no corpo humano (por exemplo: nos hepatócitos do fígado) atuando como um pró-oxidante ou pela redução dos níveis antioxidantes e contribuindo para a progressão de uma variedade de doenças crônicas.⁽⁴⁾ Os radicais oxigênio induzidos pelo álcool podem ser atenuados pela conversão dos anions superóxidos em peróxido de hidrogênio e o peróxido de hidrogênio em água, via superóxido desaminase e catalase, respectivamente.⁽⁵⁾ Tais mecanismos resultam na prevenção da deteriorização peroxidativa no organismo.⁽⁶⁾

Os resultados negativos de uma bebedeira (ressaca), induzida pelo álcool, tornou-se recentemente uma causa de interesse, primeiramente devido a perda de saúde humana. Uma ressaca geralmente ocorre, entre os

bebedores sociais, de 8 a 16 horas após a ingestão do álcool⁽⁷⁾ e resulta em dores de cabeça, náusea, diarreia, anorexia e fadiga.⁽⁸⁾ O acetaldeído, um metabólico tóxico do álcool, tem sido caracterizado como a causa maior dos sintomas de uma ressaca de mostrou-se estar ligado a compostos de enxofre, tais como a cisteína e o glutathione nos microsomas do fígado, resultando em dano hepático.⁽⁹⁾

Dentre as *conseqüências sociais* tem-se que o uso do álcool está implicado em 8% de todos os acidentes de trânsito e 40% de todos os acidentes fatais,⁽¹⁰⁾ e em 24% de todos os assaltos. Tais fatos são mais problemáticos entre os jovens com 15 a 29 anos de idade.

Motoristas com idades entre 21 e 24 anos de idade apresentaram os maiores índices de intoxicação nos acidentes fatais no ano 2000.⁽¹⁰⁾ Soma-se a isto, que 37% dos acidentes violentos envolvendo o álcool foram acometidos por jovens com idade entre 15 a 29 anos.

Um grande número; de dependentes do álcool também usam outras drogas, sendo parte deles dependentes delas. Vários trabalhos mostram altos níveis de uso combinado de álcool e drogas entre os jovens,^(11,12) principalmente maconha e cocaína.⁽¹³⁾

A dependência química é uma doença gradativa (progressiva), ninguém se torna um dependente do dia para a noite. Inicia-se, geralmente, pelo uso de drogas legais, como álcool e cigarro. A partir de então, pode ter início a adicção às drogas ilegais como maconha, cocaína, crack, etc.

Embora diversos estudos empíricos tenham relacionado o alcoolatra crônico com acidentes no trabalho,⁽¹⁴⁾ outros estudos sobre ferimentos não

fatais no local de trabalho, nos Estados Unidos, sugerem que é pequena a proporção de pessoas intoxicadas no momento do acidente.⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ O mesmo pode-se dizer do jovem trabalhador.⁽¹⁴⁾

Já a ingestão exagerada de *bebidas alcoólicas* pelos *estudantes universitários* é comum e preocupante. Em duas pesquisas utilizando universitários, 85% dos alunos de graduação informaram ter ingerido bebidas alcoólicas no último ano.^(19,20) Num destes .. trabalhos, 62,5% dos estudantes universitários informaram ter bebido nos últimos 30 dias, e 3,6% relataram o uso diário.⁽²⁰⁾ No outro trabalho, verificou-se, após entrevista de mais de 45 mil alunos de graduação de 87 instituições norte-americanas, que 19,2% deles apresentavam um consumo de álcool de pelo menos três vezes por semana (27,3% dos homens e 13,9% das mulheres).⁽¹⁹⁾

Muitos estudantes bebem exageradamente e de maneira prejudicial. No trabalho de Presley, *et al.*⁽¹⁹⁾, os universitários informaram consumir uma média de 4,3 doses-padrão por semana (6,7 doses para os homens e 3 doses para as mulheres); 10% consumiram uma média de 15 ou mais doses por semana.⁽²¹⁾ Wechsler *et al.*⁽²²⁾ entrevistou 17.592 estudantes de 140 faculdades e verificou que 44% haviam tomado bebedeiras, definido como cinco ou mais doses tomadas em seguida uma da outra, para os homens, e 4 doses para as mulheres, em pelo menos uma ocasião nas duas semanas anteriores à pesquisa. Da amostra, 19% relatou três ou mais bebedeiras nas duas semanas precedentes à pesquisa. Engs, *et al.*⁽²³⁾ entrevistaram 12.000 estudantes de todos os estados dos Estados Unidos no ano Acadêmico de 1993-1994 e

identificaram 20,6% como bebedores inveterados (que consumiram cinco ou mais doses-padrão em cada ocasião, pelo menos uma vez por semana).

Enquanto o estudante médio tomava 9,6 doses por semana, 31% dos homens consumiram mais de 21 doses por semana e 19,2% das mulheres consumiam habitualmente mais de 14 doses por semana.

O consumo de álcool está implicado em quase todos os problemas comportamentais e de saúde dos jovens adultos, incluindo agressões sexuais,^(24,25) desempenho acadêmico prejudicado,^(19,26) vandalismo e brigas,^(23,27,28) doenças sexualmente transmissíveis^(29,30) e acidentes e mortes no trânsito.^(10,31)

O álcool foi diretamente ligado a danos aos prédios residenciais (67%), comportamentos violentos (65%), e desistências escolares (29%). Como é de se esperar, as conseqüências prejudiciais do uso do álcool aumentaram proporcionalmente à quantidade de álcool consumido.⁽³²⁾ Entre os que vão para a faculdade, as taxas de bebida aumentaram substancialmente na transição do colégio para o 1º ano de faculdade;⁽³³⁾ essas taxas diminuem progressivamente após o 1º ano,^(34,35) provavelmente à medida que o estudante assume maiores responsabilidades e torna-se mais maduro.

Dados recentes confirmam que, mesmo que o consumo de álcool seja realmente menor entre as mulheres, seu impacto pode ser maior que entre os homens, avaliado por meio do relato de problemas associados ao álcool.⁽³⁶⁾

Embora o início e o aumento do consumo de álcool, entre as mulheres seja mais tardio; elas relatam mais tentativas de suicídio, além de menor

utilização concomitante de outras drogas ilícitas comparativamente aos homens.⁽³⁷⁾

Se, por um lado, a influência das fases do ciclo menstrual sobre os padrões de consumo alcoólico ainda é um tema controverso, a influência do consumo de álcool sobre o funcionamento hormonal feminino já encontra referências consistentes.⁽³⁸⁻⁴⁰⁾

A respeito da relação *álcool e gravidez*, embora Aristóteles já houvesse observado que mulheres alcoólatras davam à luz a crianças, como elas mesmas, taciturnas e indolentes,⁽⁴¹⁾ só após as observações isoladas de Le Moine *et al.*⁽⁴²⁾ na França, em 1968, e Jones e Smith⁽⁴³⁾ nos Estados Unidos, em 1973, que a teratogenicidade do alcoolismo materno foi solidamente estabelecida.

O uso de álcool durante a gravidez pode trazer inúmeros problemas para a criança, incluindo hiperatividade, déficits de atenção, aprendizado e memória. Diversos fatores podem contribuir para o surgimento de problemas no feto: padrão de consumo de álcool, metabolismo materno, suscetibilidade genética, período da gestação em que o álcool foi consumido e vulnerabilidade das diferentes regiões cerebrais da criança¹. Atualmente sabe-se que os riscos para o feto aumentam com o nível de consumo e a frequência de uso.^(41,43)

A mais grave das conseqüências relacionadas ao consumo de álcool durante a gestação é a Síndrome Fetal Alcoólica (SFA) que foi descrita pela primeira vez por Jones e Smith^(43,44) em 1973.

A criança com SFA apresenta algumas anormalidades faciais e exibe déficit intelectual, problemas cognitivos e problemas comportamentais.^(43,45)

Apesar de apresentar inúmeras limitações intelectuais, a criança com SFA apresenta boa performance nos testes de linguagem, mas ainda assim apresenta dificuldades nos testes de aritmética e em seu desenvolvimento sócio-emocional.

Outra grave consequência do uso de álcool durante a gravidez é o chamado Efeitos Relacionados ao Álcool (ERA).⁽⁴³⁻⁴⁵⁾

Crianças que apresentam ERA apresentam algumas das características dos pacientes com Síndrome Fetal Alcoólica, mas geralmente exibem melhor performance nos testes de inteligência

Amostras de sangue foram analisadas durante o processo, verificando a concentração dos 2 hormônios que controlam a lactação: ocitocina e prolactina.

O álcool afetou os 2 hormônios da seguinte maneira: ocitocina sofreu um decréscimo de 78%, e a prolactina aumentou em 336%, comparada quando as mulheres ingeriram apenas suco de laranja.

"Em condições normais de aleitamento materno a ocitocina e prolactina tendem a se comportar de maneira semelhante. Porém, com o consumo de álcool a resposta desses 2 hormônios que regulam a lactação foi divergente."

O alcoolismo materno crônico foi, então, associado a um padrão específico de malformações congênitas, chamadas de "Síndrome do Alcoolismo Fetal" (SAF).^(43,44) A síndrome inclui retardo do crescimento pré e pós-natal, dimorfismo facial, ptosis, estrabismo, fissura palpebral curta, anomalias dos membros, disfunção do Sistema Nervoso Central;⁽⁴⁵⁾ microcefalia, defeitos cardíacos,⁽⁴³⁻⁴⁷⁾ e anormalidades renais.⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾

Jones *et al.*,⁽⁴³⁾ Jones e Smith,⁽⁴⁴⁾ Hanson, *et al.*,⁽⁴⁶⁾ Shorey *et al.*,⁽⁵⁰⁾ Detering *et al.*⁽⁵¹⁾ e Abel e Greizerstein,⁽⁵²⁾ demonstraram que a SAF não é causada pela deficiência nutricional materna. O cariótipo é normal.⁽⁵³⁾

Muitos estudos tem demonstrado uma associação entre o consumo de álcool e um maior risco de câncer de mama.⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾ Um estudo clássico e freqüentemente citado na literatura médica realizou a análise combinada dos 6 maiores estudos sobre esta associação.^(54,57-60) Um total de 322.647 mulheres foram acompanhadas por até 11 anos, com um total de 4.335 diagnósticos de câncer de mama invasivo no período. A análise combinada dos estudos mostrou um aumento linear no risco de câncer de mama com consumos progressivamente maiores de álcool.

Para cada aumento na ingestão de 10 gramas ao dia (0,75 a 1 drinque) houve um aumento de 9% no risco da doença. Mulheres com um consumo entre 2 a 5 drinques ao dia foram as que apresentaram maior risco, com um aumento no risco em 41%. O estudo não demonstrou uma diferença no risco entre as diferentes bebidas analisadas, que foram cerveja, vinho e destilados.

Um possível mecanismo para um maior risco da doença, segundo o estudo, pode ser o aumento nos níveis de estrógeno sanguíneo que ocorre devido ao consumo de álcool. Smith-Warner *et al.*,⁽⁶¹⁾ analisando seis estudos de coorte conduzidos em quatro países distintos, investigaram a associação entre o risco do câncer de mama do tipo invasivo e o consumo de álcool. Mais de 300 mil mulheres avaliadas por até 11 anos foram incluídas no estudo, com cerca de 4.300 diagnosticadas com câncer mamário. A quantidade, bem como o tipo de bebida alcoólica consumida pela grande maioria das pacientes, não

interferiu no aumento do risco relativo para câncer de mama. Entre aquelas alcoolistas que bebiam em maior quantidade e frequência, entretanto, o aumento do consumo esteve linearmente relacionado com o aumento do risco para câncer, assim como a redução do consumo alcoólico interferiu positivamente na diminuição do mesmo risco.

Vários estudos com animais de laboratórios têm demonstrado que a ingestão de álcool pela mãe, durante a gestação, pode resultar em malformações congênitas.⁽⁶²⁻⁶⁵⁾ Esses efeitos foram comprovados no cão,⁽⁶⁶⁾ na galinha,⁽⁶⁷⁾ no camundongo,^(62,63,65) no rato,^(52,51,68-73) no macaco⁽⁷⁴⁾, no furão,⁽⁷⁵⁾ no coelho,⁽⁷⁶⁾ na cobaia⁽⁷⁷⁾ e no porco.⁽⁷⁸⁾

Nos estudos experimentais o etanol tem sido administrado por diferentes vias: injeções intraperitoniais e endovenosas, via gástrica, na água do bebedouro ou em dieta líquida.^(62-64,69,70,77-79)

Os resultados dos estudos experimentais sobre o efeito do álcool no desenvolvimento embrionário, diferem consideravelmente e não mostram uma clara relação entre as espécies animais estudadas, níveis de dosagem ou via de administração. Retardo no crescimento, redução do tamanho da ninhada, aumento da mortalidade perinatal, anomalias congênitas e distúrbios do comportamento pós-natal têm sido relatados em alguns estudos,^(62,63,69,80,81) embora em outros tais efeitos não tenham sido observados.^(71,76,82)

A deficiência de crescimento observada na maioria das crianças portadora da SAF persiste no período pós-natal, mesmo na presença de alimentação correta.⁽⁴⁵⁾ Também não há evidências que essas crianças

apresentem redução dos níveis de hormônio do crescimento, cortisol ou gonadotropinas.^(69,83)

Retardo do crescimento fetal e pós-natal foi observado também em animais experimentais descendentes de mães que ingeriram álcool durante a gestação.^(51,52,69,84,85) Fetos expostos ao álcool durante a gestação exibiram também retardo no ritmo da maturação óssea.⁽⁸⁵⁾

Clarren e Smith⁽⁴⁵⁾ observaram redução de tecido adiposo em crianças portadoras de SAF.

Foi demonstrado experimentalmente em roedores que o consumo de álcool materno está associado à redução do tamanho da ninhada, como também do peso fetal.^(51,70,73,85)

Sandor e Amels^(78,80) observaram retardo no crescimento e desenvolvimento, aumento da incidência de reabsorção fetal e da mortalidade perinatal, além de anomalias do SNC em ratos Wistar descendentes de mães que ingeriram álcool no período precoce da embriogênese.

A ingestão de etanol a 15%, na água do bebedouro, não se mostrou teratogênica, mas resultou em evidente redução da sobrevivência dos filhotes de rata durante a lactação.⁽⁸⁶⁾

Etanol a 37% administrado a ratas, na água do bebedouro, antes e durante a gestação, ocasionou redução marcante no tamanho e no número de filhotes.⁽⁶⁹⁾

Henderson e Schenker⁽⁷⁰⁾ verificaram que a ingestão prolongada de álcool interfere no crescimento e viabilidade da sobrevivência de filhotes de ratos, bem como na concentração total de DNA de órgãos vitais.

Randall *et al.*⁽⁶⁴⁾ observaram efeitos teratogênicos em camundongos C57BL6J alimentados com dieta líquida contendo etanol; Chernoff⁽⁶³⁾ também relatou efeito embriotóxico e fetotóxico em filhotes de camundongos que consumiram etanol na dieta líquida antes e durante a gestação.

Randall e Taylor⁽⁶⁵⁾ alimentando camundongos com dieta líquida, contendo 1 %, 25%, ou 30% das calorias derivadas do etanol, no período compreendido entre o 5° e o 10° dia da gestação, observaram que os filhotes apresentavam adactilia, ectrodactilia, sindactilia, anoftalmia, microftalmia, exencefalia, hidrocefalia, hidroneftose, hidroureter, criptorquidismo, gastroquise, defeitos cardíacos, da aorta e da veia cava, atresia da válvula mitral e defeitos septais ventriculares.

Beauchemin *et al.*⁽⁸⁷⁾ estudando o efeito da administração de etanol a 25% na dosagem de 0,03 mil g de peso corporal, no 10° dia de gestação da rata, observaram a incidência das seguintes malformações: adactilia, enrugamento da pele, gastroquise, hérnia umbilical severa, defeitos interatrial-septal do tipo ostium secundum.

O alcoolismo materno tem sido também responsável por lesões cardíacas em crianças portadoras da SAF.^(43,88-90)

Abel⁽⁹¹⁾ e Randall e Riley⁽⁹²⁾ em experimentação envolvendo alcoolismo materno crônico, observaram anomalias congênitas dos sistemas cardiovasculares, neurológicos, urogenitais e do esqueleto, além de malformações faciais.

Com relação ao alcoolismo agudo, os resultados são conflitantes. Sulik *et al.*,⁽⁹³⁾ Sulik e Johnston,⁽⁹⁴⁾ Sulik *et al.*⁽⁹⁵⁾ e Webster *et al.*⁽⁹⁶⁾ não observaram

aumento da incidência de malformações cardiovasculares. Enquanto que Webster *et al.*⁽⁹⁶⁾ e Daft *et al.*⁽⁹⁷⁾ observaram diversas anomalias.

Estudos do desenvolvimento do coração em crianças portadoras da SAF têm revelado alterações anatômicas macroscópicas tais como: defeitos do septo ventricular, hipertrofia biventricular, displasia da artéria pulmonar, cardiomegalia, duetos arteriosos evidentes e eletrocardiogramas anormais.^(98,99)

Uphofl⁽¹⁰⁰⁾ observaram que camundongos descendentes de mães expostas ao álcool apresentaram alterações da musculatura cardíaca, particularmente das miofibrilas e na estrutura mitocondrial.

Disfunção do SNC apresenta uma das características mais comuns da SAF. Retardo mental,^(43,45) aberrações das funções do SNC, tais como: ataques epiléticos, hipotonicidade, disfunção cerebelar e hiperatividade, são freqüentemente observadas em portadores da SAF.⁽¹⁰¹⁾ Apesar disso, são poucos os estudos neuropatológicos em humanos. Clarren e Smith,⁽⁴⁵⁾ observaram migração, neuroglial aberrante, hidrocefalia, heteropatas leptomenigeal neuroglial, agenesia do corpo caloso e hipoplasia cerebelar em fetos portadores da SAF. Paralelamente aos defeitos do tubo neural foram observadas mielomeningocele e anencefalia em criança com SAF.^(45,49,102)

Numerosos estudos experimentais têm sido realizados para tentar explicar os aspectos clínicos patológicos da SAF. Baixo peso corporal, dificuldade de locomoção e de deglutição e deficiência na coordenação foram observados em cobaias cujas mães ingeriram álcool no período de gestação. Os cérebros desses fetos mostraram atraso na mielinização e imaturidades

refletidos pelo giro achatado e fissuras superficiais.⁽⁷⁷⁾ Atraso na mielinização e formação da espinha dendrítica foram observadas na prole de ratos albinos.⁽¹⁰³⁾

Alterações no desenvolvimento pós-natal do sistema noradrenérgico central,⁽¹⁰⁴⁾ alterações anatômicas macro e microscópicas, acompanhadas de alterações neuroquímicas,⁽⁵¹⁾ e degeneração microscópicas dos tecidos cerebrais fetais,⁽¹⁰⁵⁾ foram observados em ratos descendentes de mães expostas ao álcool.

Alterações morfológicas e bioquímicas no desenvolvimento do SNC,^{67,80,106)} inclusive no sistema neurotransmissor,⁽¹⁰⁷⁾ foram constatadas em animais descendentes de mães "alcoólatras".

Descendentes de ratas que receberam 5%, 15%, ou 25% de etanol na água do bebedouro durante a gestação, apresentaram diminuição do peso do cérebro e do conteúdo do RNA, retardo no desenvolvimento neuromotor.⁽⁷⁶⁾

A exposição pré-natal ao etanol produz alterações no comportamento e no aprendizado.^(76,108-110) Maia Campos⁽¹¹⁰⁾ avaliando morfométrica e estereologicamente o epitélio da língua, do palato e da glândula submandibular de fetos de ratas que receberam etanol e aguardente de cana ad libitum, no bebedouro durante o período de prenhez, observou redução no tamanho dos núcleos celulares em comparação com os fetos controle.

1.1. Revisão da Literatura

1.1.1. Lactação

A lactação é um processo multifásico complexo, que inclui o desenvolvimento estrutural da glândula mamária, o início da secreção do leite até o parto e a manutenção da produção no pós-parto. Ela é influenciada por um número de fatores endócrinos: da pituitária, ovário, adrenal e tireóide. O ato de sugar resulta na liberação reflexa de oxitocina da pituitária posterior e prolactina da pituitária anterior. A oxitocina é responsável pela contração de células mioepiteliais ao redor dos alvéolos, resultando na ejeção de leite da glândula mamária, e a prolactina promove a síntese do leite.

É como disse Short:⁽¹¹¹⁾ "a oxitocina serve a refeição de hoje e a prolactina prepara a de amanhã".

1.1.2. Álcool e Lactação

Abel⁽¹¹²⁾ observou que animais lactentes, cujas mães bebiam etanol, apresentaram níveis de crescimento significativamente menores que os do controle; e que sob tais condições, a tolerância ao etanol no período da lactação também pode ocorrer. Redução no ganho de peso também foi observado em ratos após desmame, injetados com dose intoxicantes de etanol, porém a mesma quantidade de etanol consumida voluntariamente não afetava o crescimento.⁽¹¹³⁾

De modo similar, enquanto a injeção de etanol na camundonga lactante, retardava o nível de crescimento dos seus filhotes,⁽¹¹²⁾ o consumo de etanol via bebedouro pela camundonga lactante no período de 7 a 14 dias do parto não influenciava o nível de crescimento dos filhotes.

Quando altas concentrações de etanol são administradas, quer como parte de dieta líquida⁽⁵⁰⁾ ou na água de beber,⁽⁶⁹⁾ há uma redução marcante no consumo de alimento. Ocorre então malnutrição das mães prenhas ou lactantes. Detering *et al.*⁽⁵¹⁾ administrando em ratos uma dieta líquida contendo 35% das calorias na forma de etanol ou dieta líquida isoenergética (maltose-dextrina), verificaram que a administração de etanol em ratas prenhas ou lactantes implicava em crescimento físico diminuído, inclusive do sistema nervoso central, dos seus filhotes, maior do que aquelas alterações ocasionadas pela privação nutricional.

A ingestão continuada de etanol, durante a lactação, altera a composição química do leite,⁽¹¹⁴⁻¹¹⁵⁾ resultando no aparecimento do etanol e acetaldeído no leite⁽¹¹⁶⁾ e exacerba os efeitos do etanol no neonato.⁽⁵⁷⁾ Jones e Stewart⁽⁵⁴⁾ observaram glândulas mamárias menos pesadas, como também com alterações histológicas na gordura e células epiteliais do tecido mamário, em ratas que receberam etanol na água de beber. Tais alterações podem contribuir para os defeitos funcionais observados na glândula mamária dos ratos tratados com etanol. Steven *et al.*⁽¹¹⁷⁾ observaram que no segundo dia da lactação do rato, o etanol provocou uma diminuição significativa na porcentagem de epitélio alveolar e um aumento significativo do tecido conjuntivo total.

Entretanto, no 10º dia da lactação não observaram qualquer alteração glandular o tratamento crônico com etanol através da lactação, induz distúrbios metabólicos importantes nas mães, incluindo alterações na função da glândula mamária que levam a uma diminuição na produção total de leite, com conteúdo aumentado de lipídios.⁽⁵⁸⁾ Tavares-do-Carmo e Nascimento-Curi,⁽⁵⁹⁾ observaram conteúdo diminuído de proteína na glândula mamária e lipogênese aumentada na glândula. Esta atividade lipogênica aumenta também o conteúdo de triglicérides na glândula mamária do rato tratado com etanol durante a lactação.⁽¹¹⁸⁾

Os efeitos adversos do álcool na glândula mamária de animais, também foram observados por Vilaró *et al.*,⁽¹¹⁹⁾ Viñas *et al.*,⁽¹¹⁵⁾ e Sanchis e Guerri.⁽¹¹⁴⁾ Foi observado que ratas lactantes submetidas aos efeitos do álcool e separadas do filhote, não evidenciavam diferença na prolactina basal, enquanto que naquelas ratas que os filhotes sugavam o leite a prolactina estava inibida.⁽¹²⁰⁻¹²³⁾

Trabalhos pioneiros mostraram que o álcool tem um efeito inibitório na liberação da ocitocina na coelha lactante,⁽¹²⁴⁾ rata lactante⁽¹²⁵⁾ e na mulher amamentando.⁽¹²⁶⁾ Na mulher, o álcool inibiu a ejeção de leite numa maneira dose-dependente.⁽¹²⁷⁾ Outros estudos, onde foram medidos os níveis sanguíneos de hormônios, o álcool inibiu as respostas da ocitocina⁽⁵⁵⁾ e prolactina⁽⁶⁰⁾ após estimulação do peito.

Subramanian⁽¹²⁸⁾ observou que a administração de álcool, durante os períodos de 5 a 8 e 8 e 9 a 12 dias da lactação, inibia a liberação de prolactina (induzida pela sucção) e diminuía o consumo de leite pelos filhotes.

Heil *et al.*⁽¹²⁹⁾ observaram no rato que o etanol reduziu o peso materno, porém não o do filhote. O nível de ferro sérico estava aumentado, como também o do colesterol sérico e da fosfatidilserina.

Tavares-do-Carmo *et al.*⁽¹³⁰⁾ observaram que a ingestão materna de álcool diminuiu a produção de leite, ocasionando má-nutrição severa no filhote de rato. Esta é compensada parcialmente pelo conteúdo aumentado de lipídios no leite, que leva a adaptações metabólicas a fim de prevenir hipoglicemia severa e manter níveis mínimos de glicogênio hepático. Entretanto, essas adaptações não são suficientes para proteger o desenvolvimento normal do cérebro, o qual está diminuído nesses animais.

Little *et al.*⁽¹³¹⁾ demonstraram que em humanos o etanol ingerido através do leite materno, apresenta efeito leve porém significativo no desenvolvimento motor (mas não mental) em crianças lactentes. Entretanto é comum recomendar às lactantes, pequenas doses de álcool como fator auxiliar para a lactação, já que o mesmo promove calorias e fluidos adicionais,⁽¹³²⁾ e facilita o reflexo de ejeção.⁽¹³³⁾ Estes dados sugerem que o consumo seguro de álcool, particularmente no que se refere à presença ou ausência de efeitos prejudiciais à lactação, pode depender da dose consumida. Entretanto, foi mostrado que ingestões baixas de etanol (5%), pela rata lactante, diminuem a concentração de retinol no leite e reduz a ingestão de alimento.⁽¹³⁴⁾ A adição de etanol na água de beber na proporção de 10% e 20% induziu alterações no metabolismo materno e filhotes com crescimento diminuído. Entretanto, quando a dose foi pequena não houve alteração no crescimento dos filhotes, mesmo que ela ocasione alterações no metabolismo da rata lactante.⁽¹³⁵⁻¹³⁶⁾

Heil e Subramanian⁽¹³⁷⁾ observaram que os filhotes de rato apresentaram crescimento retardado, e que tal fato sugere que é a inibição da oxitocina, em lugar da prolactina induzida pela sucção, a responsável principal do retardo de crescimento durante a lactação.

Oyama *et al.*^(135,136) observaram que a ingestão materna de álcool afeta o desenvolvimento dos filhotes e é dose-dependente. Ingestão alta de álcool na água de beber (10% a 20%) causa diminuição no peso corporal, do fígado e altera também o metabolismo da glicose cerebral. Embora a ingestão baixa de álcool (5%) não altere o peso corporal dos filhotes e os pesos do cérebro e fígado, ela afeta o metabolismo da glicose cerebral.

Tendo-se em vista que a lactação, durante a qual a maioria dos órgãos ainda está em desenvolvimento, incluindo o cérebro,⁽¹³⁸⁾ é um período importante e vulnerável, e que a exposição materna ao álcool durante esta fase poderá ocasionar ainda efeitos adversos no desenvolvimento dos filhotes, são objetivos deste trabalho:

1.2. Objetivos

- a. estudar histopatologicamente o epitélio do palato;
- b. como também o osso palatino;
- c. avaliando cariometrica estereologicamente tais estruturas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizadas 10 ratas albinas, variedade Wistar, pesando em média 200 gramas, juntamente com 80 filhotes escolhidos ao acaso, de várias ninhadas, as quais foram colocadas em gaiolas individuais, e receberam alimento sólido e líquido ad libitum.

2.2. Tratamento

As ratas foram divididas em dois grupos:

- **Grupo I:** 5 ratas com 8 filhotes cada uma, e receberam etanol a 20% na água do bebedouro, durante toda a lactação (21 dias).
- **Grupo II:** 5 ratas com 8 filhotes cada uma, e receberam somente água no bebedouro, durante toda a lactação e serviram de controles.

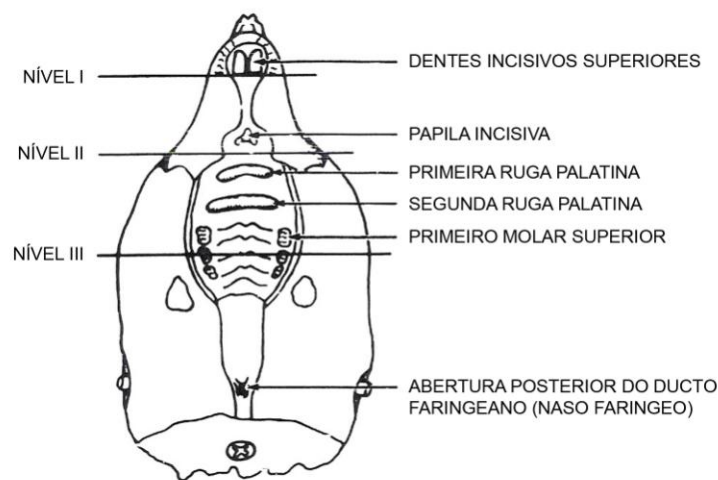
Para a análise histométrica foram separados aleatoriamente 5 filhotes controle e 5 filhotes tratados com etanol.

As ratas de ambos os grupos receberam ração comercial, etanol ou água, ad libitum.

2.3. Técnica de Dissecção e Técnica Histológica

No 21º dia de lactação os filhotes foram sacrificados por sobredosagem anestésica (injeção de Hypnol a 3%). As cabeças dos filhotes foram separadas

dos corpos e, imediatamente, imersas em solução fixadora de álcool a 80% - 85 rnl, formalina pura - 10 ml e ácido acético - 5 rnl, onde permaneceram a fixar durante 24 horas à temperatura ambiente. Seqüencialmente, o material foi imerso em solução de citrato de sódio 20% e ácido fórmico 30%, em partes iguais, para descalcificação. Após fixação, descalcificação e desidratação, as cabeças foram desarticuladas e seccionadas no plano frontal, ao nível dos molares (nível III),⁽¹³⁹⁾ e incluídos em parafina (Figura 1).



Fonte: Boorman *et al.*⁽¹³⁹⁾

Figura 1. Desenho da face ventral do crânio mostrando os pontos de referência para os três níveis para os cortes nasais.

Foram obtidos cortes seriados com 6 micrômetros de espessura, os quais foram corados com hematoxilina e eosina.

2.4. Técnica Morfométrica

2.4.1. Cariometria

Para obter-se os diâmetros maior e menor dos núcleos das células dos tecidos estudados, os cortes foram focalizados ao microscópio óptico JENAMED, com objetiva de imersão (100X), munido de uma câmara clara JENA.

Os núcleos foram projetados sobre papel, com aumento final de 1000X. As imagens nucleares obtidas, 50 para cada estrutura estudada em cada órgão de cada animal de cada grupo, foram então contornados com lápis preto número 2, tomando-se o cuidado de considerar somente as imagens elípticas. Para obtenção dos diâmetros, os eixos maior e menor dessas imagens foram medidos, empregando-se uma escala milimetrada.

Uma vez determinados os diâmetros maior (D) e menor (d), foram estimados os seguintes parâmetros cariométricos:⁽¹⁴⁰⁾

$$\text{Diâmetro geométrico médio: } M = (D.d)^{1/2}$$

$$\text{Relação entre os diâmetros maior e menor: } \frac{D}{d}$$

$$\text{Perímetro: } P = \left(\frac{\pi}{2}\right) \cdot [1,5 \cdot (D + d) - M]$$

$$\text{Área: } A = \frac{\pi}{4} \cdot M^2$$

$$\text{Volume: } V = 6^{-1} \cdot \pi \cdot M^3$$

$$\text{Relação entre o volume e a área: } \frac{2}{3} \cdot M$$

$$\text{Coeficiente de forma: } F = 4 \cdot \pi \cdot \frac{A}{P^2}$$

$$\text{Índice de contorno: } I = \frac{P}{A^{1/2}}$$

$$\text{Excentricidade: } E = \frac{(D + d)^{1/2} \cdot (D - d)^{1/2}}{D}$$

2.4.2. Volume, Área e Perímetro dos Osteócitos

Os diâmetros maior e menor dos osteócitos das trabéculas ósseas do osso palatino dos ratos de ambos grupos estudados, foram determinados utilizando-se a técnica empregada para a cariometria, descrita anteriormente.

Foram determinados os seguintes parâmetros morfométricos:

Volume: $V = 6^{-1} \cdot \pi \cdot M^3$, onde M é o diâmetro geométrico médio.

$$\text{Área: } A = \pi \cdot \frac{M^2}{4}$$

Perímetro: $P = \left(\frac{\pi}{2}\right) \cdot [1,5 \cdot (D + d) - M]$, onde D e d são os diâmetros maior e

menor.

2.5. Técnicas Estereológicas

Neste trabalho utilizou-se uma grade idealizada por Merz⁽¹⁴¹⁾ impressa sobre papel, que consiste num quadrado, que limita uma área teste, contendo um sistema de pontos marcados sobre linhas sinuosas formadas por uma sucessão de semicírculos encadeados, conforme mostra a Figura 2.

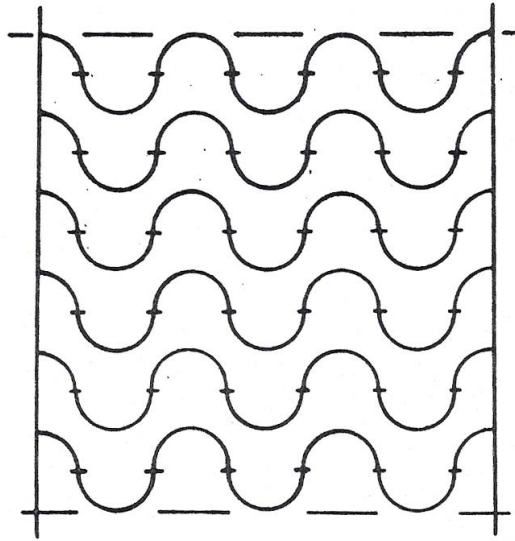


Figura 2. Representação gráfica da grade idealizada por Merz.⁽¹⁴¹⁾

Os cortes foram focalizados ao microscópio óptico JENAMED, com objetiva de aumento de acordo com a exigência da análise a ser realizada, munido de câmara clara JENA. As imagens obtidas foram desenhadas sobre a grade.

A grade de Merz⁽¹⁴¹⁾ pode ser usada tanto para contar pontos sobre uma determinada estrutura histológica como para contar intersecções entre duas estruturas contíguas, bastando para isso considerar o número de pontos que caem sobre a estrutura em estudo, no primeiro caso, ou o número de vezes em que as superfícies vizinhas cortam a linha curva, no segundo caso.

2.5.1. Epitélio de Revestimento do Palato

Com a finalidade de avaliar os volumes citoplasmáticos e celulares, a relação núcleo/citoplasma, as densidades numérica e de superfície, a relação

entre a superfície e a camada basal e a espessura das superfícies estudadas, foram feitas contagens de pontos e intersecções e aplicadas às equações estereológicas apropriadas para cada uma das variáveis.

Relação Núcleo/Citoplasma

A relação núcleo/citoplasma (N / C) é dada pela relação entre os volumes relativos do núcleo e do citoplasma, expressa pela equação:

$$\frac{N}{C} = \frac{V_{rn}}{V_{rcit}}$$

Os volumes relativos foram determinados pelo número de pontos que incidiu sobre as estruturas consideradas em relação ao número total de pontos da área teste.^(53,142,143)

Na verdade, o valor obtido assim é uma sobrestimação do valor real, devido ao chamado “efeito HOLMES”,⁽¹⁴³⁾ o qual decorre do uso de cortes histológicos de espessura finita. Essa estimacão pode ser corrigida, levando-se em consideracão o tamanho da estrutura envolvida e a espessura do corte histológico. Assim Hennig⁽¹⁴⁴⁾ propôs a seguinte equacão para a correçã do efeito Holmes, considerando os núcleos como esferas de diâmetro médio D e sendo T a espessura do corte:

$$V_{vc} = \frac{V_{rn}}{\frac{1+3T}{2D}}$$

Onde V_{vc} é a fração volumétrica dos núcleos corrigida e V_{rn} é a fração volumétrica observada. O diâmetro médio foi determinado previamente, com o emprego da cariometria.

A relação núcleo citoplasma corrigida será então:

$$\frac{N}{C} \text{ corrigida} = \frac{V_{vc}}{1 - V_{vc}}$$

Sendo $1 - V_{vc}$ a fração volumétrica citoplasmática corrigida (V_{rcit}).

Volume Citoplasmático e Volume da Célula Epitelial

O volume citoplasmático (V_{ct}) foi estimado a partir do volume nuclear e da relação núcleo/citoplasma corrigida. Por sua vez, a soma dos volumes nuclear e citoplasmático forneceu o valor estimado para a célula epitelial “média”.⁽¹⁴⁵⁾

$$V_{ct} = \frac{V_{rn}}{N / C(\text{corrigida})}$$

O volume da célula epitelial “média” é dado pela equação: $V_{cel} = V_n + V_{ct}$

Espessura Epitelial

A espessura das camadas epiteliais (E_e) das estruturas estudadas foram estimadas mediante o método de Weibel:⁽¹⁴³⁾

$$E_e = \frac{P_e \cdot L}{2(I_s + I_L)}$$

Onde P_e é o número de pontos que estão sobre o epitélio, L é o comprimento da linha teste, I_s e I_L são o número de intersecções da linha-teste com a superfície externa do epitélio e com a interface epitélio/conjuntivo, respectivamente.

Relação Superfície Livre/Camada Basal

Esta relação (SI / Sb) pode ser estimada pelo quociente entre os números de intersecções das linhas-teste com as respectivas superfícies: $\frac{SI}{Sb} = \frac{Is}{Ib}$

Onde Is é o número de intersecções da linha-teste com a superfície livre do epitélio e Ib o número de intersecções da linha-teste com a interface epitélio/conjuntivo.

Densidade de Superfície

A densidade de superfície representa a superfície de um componente tecidual por unidade de volume do tecido. Esse parâmetro foi estimado pelo método de Tomkeieff,⁽¹⁴⁶⁾ segundo o qual a densidade de superfície de um componente (Su) é proporcional ao número de intersecções (li) das linhas-teste com a superfície estimada, e inversamente proporcional ao comprimento das linhas-teste (Lt).

$$Su = \frac{2.li}{Lt}$$

O método acima descrito foi utilizado para estimar as densidades de superfícies das estruturas estudadas de animais controles e tratados.

Densidade Numérica

Uma vez conhecido o volume celular médio, o número de células por unidade de volume do tecido epitelial pode ser avaliado por meio da relação:

$$\frac{N_{cel} / mm^3}{V_{cel}} = 10^9$$

A potência 10^9 refere-se à transformação de 1 mm^3 em micrometros cúbicos, uma vez que o denominador (volume celular médio) é dado em micrometros, e é necessário harmonizar as unidades de medida.

Espessura Média do Epitélio

A espessura média do epitélio foi estimada, aplicando a fórmula de Weibel:⁽¹⁴³⁾

$$E = \frac{P.L}{2(IK + Ict)}$$

Onde P é o número de pontos que ficaram sobre o epitélio, L o comprimento da linha-teste, IK e Ict são os números de intersecções da linha-teste com a interface – superfície e epitélio conjuntivo, respectivamente.

Densidade de Volume

Com a finalidade de se avaliar percentualmente as estruturas do osso palatino, empregou-se neste trabalho a técnica de Chalkey,⁽⁵⁶⁾ cuja fórmula é:

$$Vr = \frac{Pe}{Pt}$$

Onde Pe são pontos contados sobre a estrutura estudada e Pt são os pontos totais.

2.6. Técnica Estatística

Para o confronto estatístico dos resultados deste trabalho foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon – Mann-Whitney. Para os diversos cálculos

matemáticos envolvidos nos estudos histométricos, foram utilizados diversos programas para computador do tipo IBM-PC, em linguagem Basic Avançado (Básica) elaborados pelos Profs.Drs. Geraldo Maia Campos e Miguel Angel Sala di Matteo, do Departamento de Estomatologia da FORP/USP, visando ao processamento dos dados experimentais.

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Morfológicos

Peso Corporal

O peso corporal dos filhotes de ratas tratadas com etanol, durante a lactação era menor significativamente (20,20g), quando comparado aos dos filhotes de mães controles (34,86g) (Tabela 1, $P < 0,01$).

Histopatologia

Grupo Controle

A membrana mucosa do palato duro está firmemente fixada no periósteeo e, portanto, não se movimenta. O epitélio é do tipo pavimentoso estratificado ceratinizado. A lâmina própria, uma camada de tecido conjuntivo denso, é mais espessa na porção anterior do palato: próximo à região gengival, o epitélio emite longas papilas em direção à lâmina própria. Não é visível a divisão entre a lâmina própria e a camada submucosa (figura 3).

O osso palatino é do tipo esponjoso, constituído de trabéculas delicadas formando uma rede separada por um labirinto de espaços interconectados contendo a medula óssea. As trabéculas são delgadas e constituídas por lamelas irregulares de osso com lacunas osteoplastos contendo os osteócitos. As trabéculas estão limitadas por uma camada delicada de tecido chamada endósteeo que contém células progenitoras, osteoblastos e osteoclastos. A

medula óssea está repleta de células progenitoras primitivas e de células sanguíneas maduras. São visíveis os adipócitos (figura 5 e 7) nesta idade a medula está envolvida com a hematopoiese.

Grupo Tratado

O epitélio de revestimento do palato do rato intoxicado pelo etanol, mostrou-se mais delgado, com as camadas basal e espinhosa também mais delgadas. Também a camada córnea era mais fina. Os núcleos das camadas basal e espinhosa eram mais volumosos (figura 4). A lâmina própria estava edemaciada.

As trabéculas ósseas do osso palatino eram mais delicadas, menos calcificadas, com osteócitos de menor tamanho. A medula continha muitos adipócitos (figura 6 e 8).

Tabela 1. Medidas dos pesos corporais (em gramas) dos filhotes controles e tratados pelo etanol. Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney

Controle	Tratado
35,50	20,40
33,70	19,80
37,80	19,60
35,10	20,20
32,20	21,00
\bar{X}	\bar{X}
34,86	20,20
$U_{calc} = 0^*$	$P[U] = 0,004$

(*) $p < 0,01$

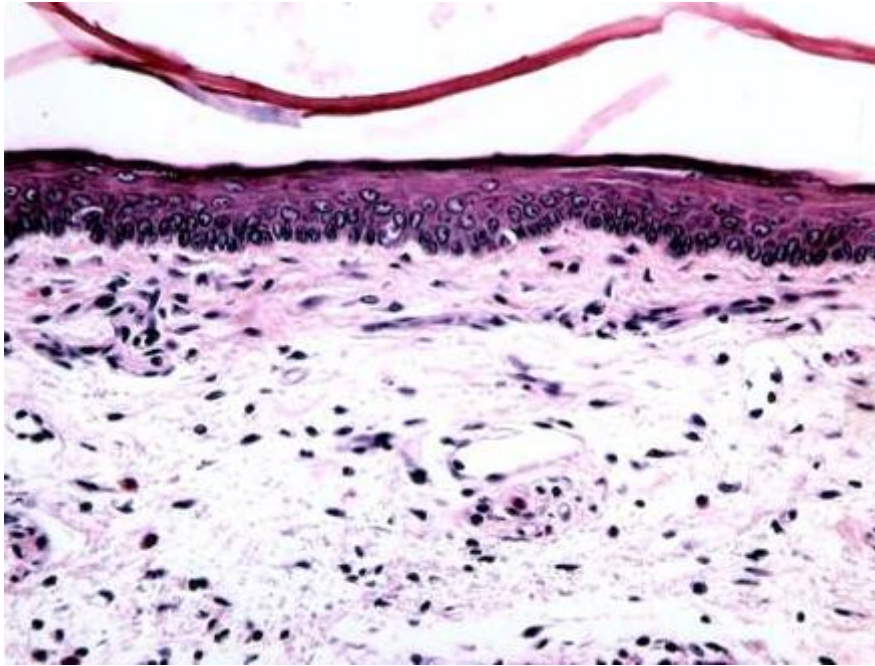


Figura 3. Aspecto histológico do palato de rato controle. Notar as camadas epiteliais e lâmina própria vascularizada. HE (200x).

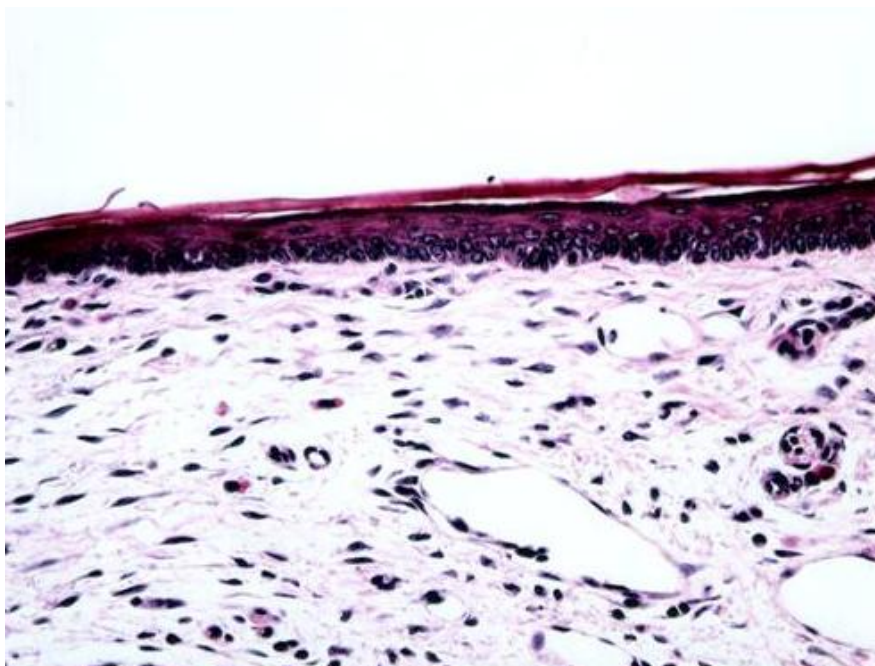


Figura 4. Aspecto histológico do palato de rato intoxicado pelo etanol, durante a lactação. Notar epitélio delgado e lâmina própria edemaciada. HE (200x).

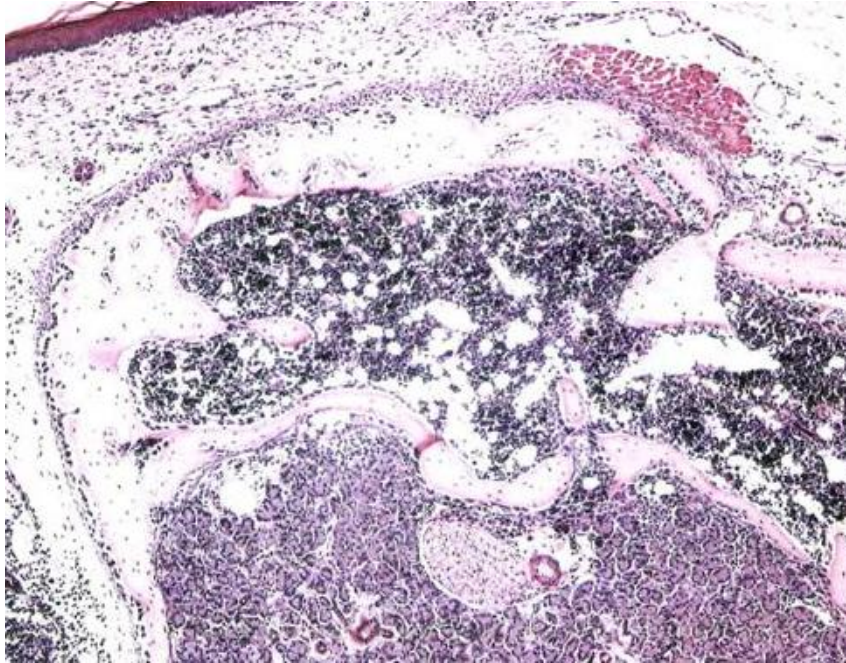


Figura 5. Aspecto histológico do osso palatino de rato controle. Notar trabéculas ósseas e medula hematopoiética. HE (50x).

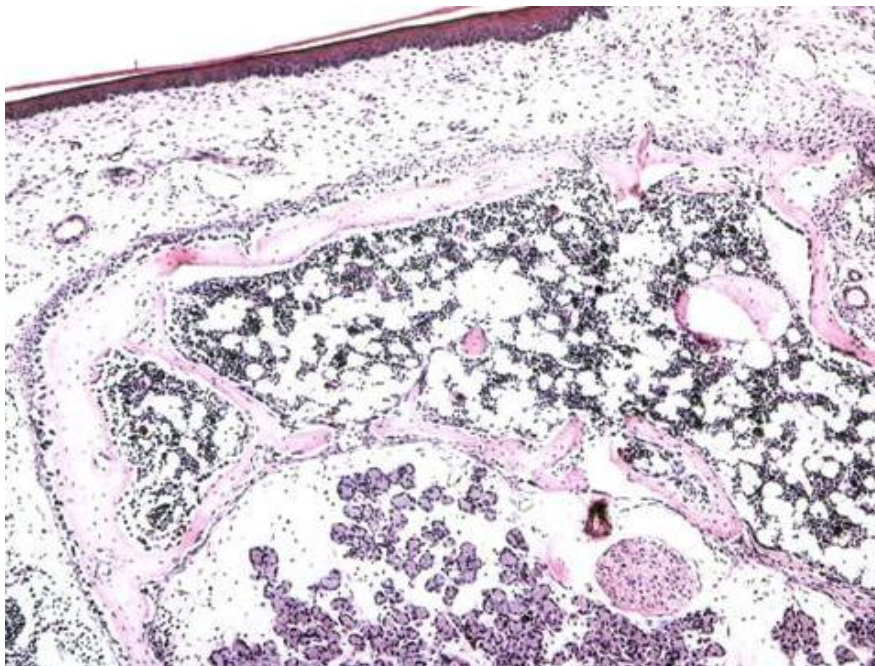


Figura 6. Aspecto histológico do osso palatino de rato tratado com etanol, durante a lactação. Notar trabéculas mais delicadas, e medula hematopoiética escassa repletas de células adiposas. HE (50x).

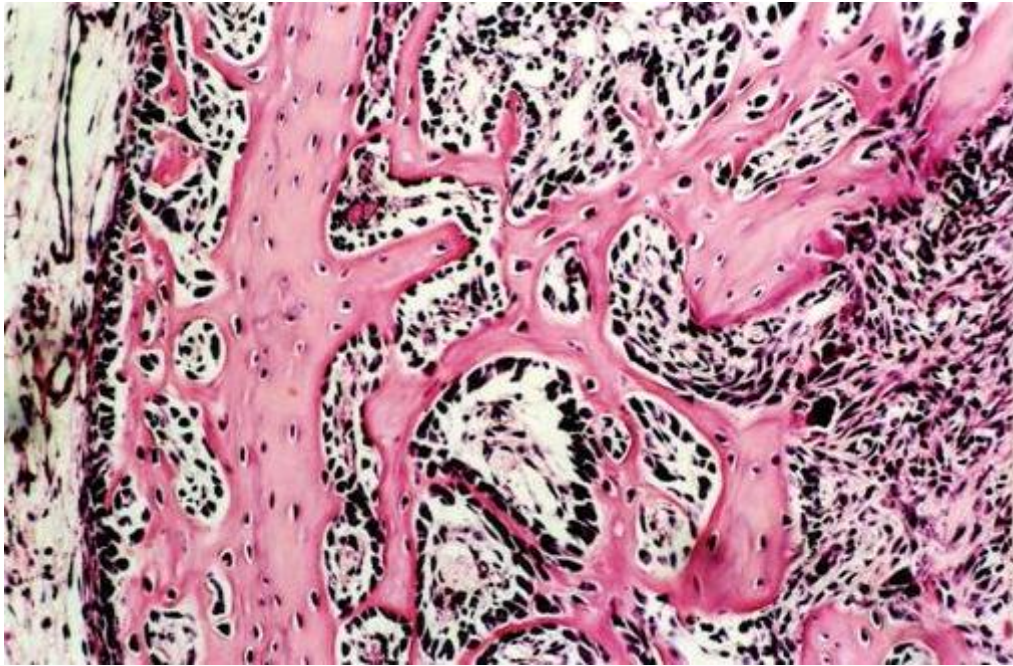


Figura 7. Aspecto histológico do osso palatino de rato controle. Notar trabéculas ósseas e tecido medular. HE (450x).

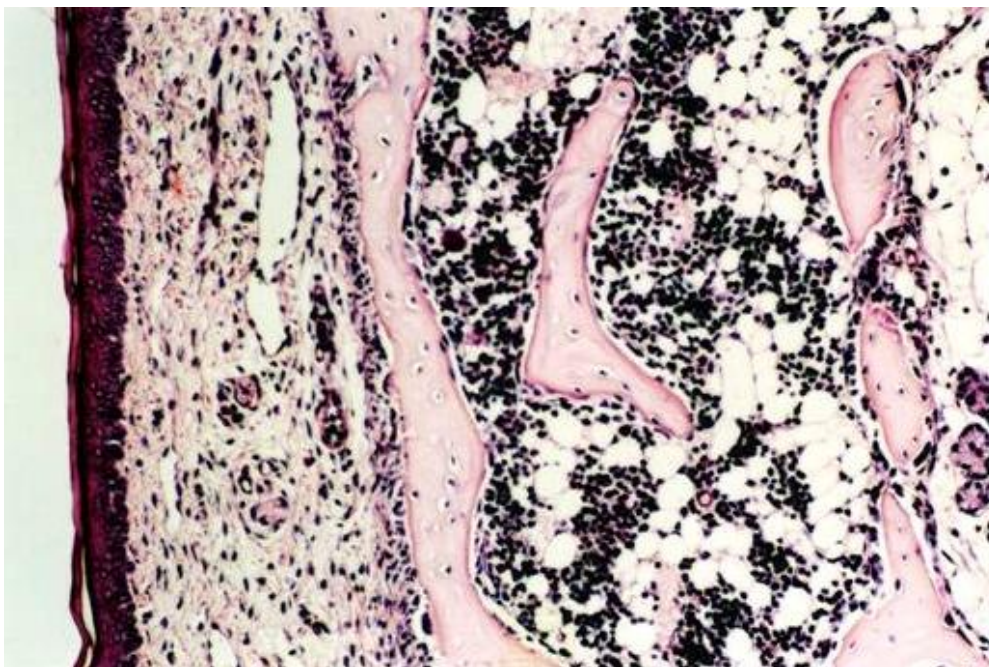


Figura 8. Aspecto histológico do osso palatino de rato tratado com etanol, durante a lactação. Notar trabéculas ósseas delicadas, pouco calcificadas e medula hematopoiética escassa e com tecido gorduroso mais abundante. HE (450x).

3.2. Morfométricos

3.2.1. Cariometria

3.2.1.1. Epitélio de Revestimento do Palato

Camada Basal

Os diâmetros maior, menor e médio dos núcleos das células da camada basal do epitélio de revestimento do palato dos filhotes, cujas mães foram intoxicadas pelo etanol, conforme pode-se constatar na tabela 2, foram respectivamente: 12,25 μm ; 6,21 μm e 8,59 μm , enquanto que os dos filhotes controles foram respectivamente: 12,29 μm ; 5,48 μm^* e 8,17 μm^* . O teste de Wilcoxon – Mann-Whitney mostrou significância nos confrontos diâmetros menor e médio (* $p < 0,01$ e $p < 0,05$).

Analisando-se ainda a tabela 2, constatou-se a relação D/d do filhote tratado era significativamente menor (1,73) em função do controle (1,94**) (** $p < 0,05$).

Consultando-se a tabela 3, constatou-se que o volume nuclear médio não era estatisticamente significante ao confronto controle x tratado (286,85 μm^3 e 311,34 μm^3 , respectivamente). A área nuclear mostrou valores iguais a 63,40 μm^2 para o controle e 69,11 μm^2 para o tratado, sendo tal diferença estatisticamente significante para $x = 0,05$. O perímetro nuclear mostrou valores semelhantes nos dois grupos de animais estudados (33,28 μm e 33,41

µm para os controle e tratados respectivamente). A relação N/C mostrou valor aumentado nos filhotes tratados (4,05) em função do controle (3,74) ($p < 0,05$).

A excentricidade, o coeficiente de forma e o índice de controle nos núcleos das células da camada basal do epitélio palatino dos filhotes tratados, conforme observado na tabela 4, foram respectivamente: 0,72; 0,54 e 3,72, enquanto que os dos filhotes controles foram respectivamente: 0,74**; 0,46* e 3,87**. O confronto estatístico mostrou significância nos três parâmetros estudados (* $p < 0,01$ e ** $p < 0,05$), evidenciando um núcleo de forma mais arredondada.

Camada Espinhosa

Analisando-se a tabela 5 verificou-se que os diâmetros maior, menor e médio dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio palatino, eram iguais a 11,25 µm, 7,84 µm e 9,36 µm para o filhote intoxicado e respectivamente iguais a: 11,00 µm, 7,53 µm e 8,97 µm ** para o filhote controle.

O teste de Wilcoxon – Mann-Whitney acusou diferença estatisticamente significativa somente para o diâmetro médio ($p < 0,05$). Quando se analisou a relação D/d, verificou-se não haver diferença no confronto efetuado (1,24 para o controle e 1,22 para o tratado).

Os valores médios para o volume, área, perímetro e relação V/A (tabela 6) eram maiores nos núcleos das células espinhosas do epitélio palatino do filhote intoxicado (626,20 µm³, 88,77 µm², 30,27 µm e 6,24), quando

comparados aos valores dos controles ($553,61 \mu\text{m}^3$ **, $76,09 \mu\text{m}^2$ **, $29,00 \mu\text{m}$ e $5,97$ **), sendo estas diferenças estatisticamente significantes para $X = 0,05$.

Observando-se a tabela 7, verificou-se que os valores para excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno eram similares nos dois grupos de filhotes, não sendo estatisticamente significante.

Tabela 2. Valores cariométricos médios para diâmetros (μm) maior, menor e médio, e relação diâmetro maior / diâmetro menor dos núcleos das células da camada basal do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicado pelo etanol (T). Teste de Wincoxon – Mann-Whitney.

Diâmetro Maior		Diâmetro Menor		Diâmetro Médio		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
11,91	12,08	5,35	5,88	7,94	8,39	1,93	1,77
12,23	12,02	5,43	6,77	8,11	8,98	1,95	1,51
11,71	12,02	5,74	5,82	8,14	8,33	1,77	1,78
13,31	12,42	5,39	6,14	8,43	8,70	2,15	1,74
12,31	12,70	5,51	5,79	8,20	8,54	1,93	1,84
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
12,29	12,25	5,48	6,21	8,17	8,59	1,94	1,73
Ucalc = 11ns		Ucalc = 0*		Ucalc = 2**		Ucalc = 3**	
p U = 0,421		p U = 0,004		p U = 0,016		p U = 0,028	

(*) $p < 0,01$; (**) $p < 0,05$; (ns) não significante.

Tabela 3. Valores cariométricos médios para volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação volume/área dos núcleos das células da camada basal do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicados pelo etanol (T). Teste de Wincoxon – Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
264,10	319,20	59,85	65,78	32,26	33,09	3,57	3,92
282,87	420,85	62,69	75,55	33,09	33,63	3,62	4,51
293,85	202,92	62,79	65,06	32,12	32,92	3,83	3,88
299,30	286,49	67,46	70,87	35,61	32,91	4,02	4,09
294,10	327,23	64,20	68,28	33,34	34,49	3,67	3,86
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
286,85	311,34	63,40	69,11	33,28	33,41	3,74	4,05
U _{calc} = 8		U _{calc} = 2**		U _{calc} = 11		U _{calc} = 3**	
p U = 0,0,210		p U = 0,016		p U = 0,421		p U = 0,028	

Tabela 4. Valores cariométricos médios para excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos das células da camada basal do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicado pelo etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de Forma		Índice de Contorno	
C	T	C	T	C	T
0,74	0,72	0,50	0,53	3,86	3,74
0,74	0,68	0,50	0,59	3,88	3,54
0,71	0,73	0,35	0,53	3,74	3,76
0,76	0,72	0,47	0,54	4,02	3,72
0,74	0,73	0,50	0,51	3,87	3,83
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
0,74	0,72	0,46	0,54	3,87	3,72
Ucalc = 4**		Ucalc = 0**		Ucalc = 3**	
p U = 0,048		p U = 0,004		p U = 0,028	

Tabela 5. Valores cariométricos médios para diâmetros (μm), maior, menor e médio, e relação diâmetro maior / diâmetro menor dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicado pelo etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.

Diâmetro Maior		Diâmetro Menor		Diâmetro Médio		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
11,84	11,34	7,24	8,14	8,76	9,56	1,25	1,18
10,21	11,36	7,41	8,17	8,68	9,61	1,17	1,17
10,61	10,96	7,82	7,45	9,08	9,01	1,15	1,25
11,42	11,27	7,24	7,65	9,06	9,25	1,34	1,26
10,92	11,34	7,93	7,80	9,28	9,38	1,27	1,23
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
11,00	11,25	7,53	7,84	8,97	9,36	1,24	1,22
Ucalc = 10		Ucalc = 6		Ucalc = 4**		Ucalc = 11**	
p U = 0,345		p U = 0,111		p U = 0,048		p U = 0,421	

Tabela 6. Valores cariométricos médios para volume (μm^3), área (μm^2), perímetro (μm) e relação volume / área dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicado pelo etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
518,17	666,97	72,66	86,36	28,40	30,81	5,83	6,38
504,58	681,98	71,38	37,44	27,89	30,92	5,78	6,40
567,58	555,13	77,67	76,48	29,14	29,22	6,05	5,99
566,58	603,67	77,43	80,80	29,75	30,05	6,03	6,16
611,15	623,26	81,32	82,79	29,82	30,36	6,18	6,25
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
553,61	626,20	76,09	82,77	29,00	30,27	5,97	6,24
Ucalc = 4**		Ucalc = 4**		Ucalc = 2**		Ucalc = 4**	
p U =0,048		p U =0,048		p U =0,016		p U =0,048	

Tabela 7. Valores cariométricos médios para excentricidade, coeficiente de forma e índice de contorno dos núcleos das células da camada espinhosa do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicado pelo etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.

Excentricidade		Coeficiente de Forma		Índice de Contorno	
C	T	C	T	C	T
0,59	0,57	0,78	0,79	3,07	3,04
0,56	0,57	0,80	0,80	3,04	3,04
0,54	0,59	0,80	0,78	3,04	3,07
0,63	0,59	0,80	0,78	3,11	3,07
0,55	0,58	0,80	0,78	3,04	3,06
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
0,57	0,58	0,80	0,79	3,06	3,06
U _{calc} = 11		U _{calc} = 6		U _{calc} = 12	
p U = 0,421		p U = 0,111		p U = 0,500	

3.2.1.2. Osso Palatino

Analisando-se a tabela 8, onde estão expressos os valores dos diâmetros maior, menor e médio dos osteócitos do osso palatino dos filhotes controles e intoxicados com etanol, verificou-se que os valores médios para o filhote controle eram: 13,06 μm , 10,63 μm e 11,76 μm respectivamente, enquanto que os dos intoxicados eram: 9,20 μm^* , 7,19 μm^* e 8,10 μm^* .

O confronto estatístico mostrou haver significância nos três parâmetros analisados (* $p < 0,01$). Já a relação D/d não mostrou diferença estatisticamente significativa (1,24 e 1,30 respectivamente).

O volume, a área, o perímetro e a relação V/A dos osteócitos do osso palatino (tabela 9) mostraram valores menores nos filhotes intoxicados com etanol (297,28 μm^3 , 52,71 μm^2 , 26,31 μm e 5,40), quando comparados aos dos controles (914,51 μm^3 , 111,18 μm^2 , 37,41 μm^* e 7,84*) (* $p < 0,01$).

Tabela 8. Valores histométricos médios dos osteócitos do osso palatino de ratos controles (C) e tratados com etanol (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.

Diâmetro Maior (µm)		Diâmetro Menor (µm)		Diâmetro Médio (µm)		Relação D/d	
C	T	C	T	C	T	C	T
12,64	8,24	10,04	6,64	11,24	7,37	1,26	1,24
14,56	9,56	11,06	7,80	12,69	8,62	1,32	1,24
13,84	9,12	11,68	6,28	12,69	7,51	1,19	1,48
11,76	10,00	10,20	8,08	10,93	8,96	1,16	1,26
12,54	9,12	10,08	7,16	11,26	8,05	1,27	1,29
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
13,06	9,20	10,63	7,19	11,76	8,10	1,24	1,30
Ucalc = 0*		Ucalc = 0*		Ucalc = 0*		Ucalc = 11ns	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,421	

(*) p < 0,01; (ns) não significante.

Tabela 9. Valores histométricos médios do volume (μm^3), área (μm^3), perímetro (μm) e relação V/A dos osteócitos do osso palatino de ratos controles (C) e tratados com etanol (T) durante a lactação. Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
791,73	222,43	101,28	43,54	35,79	23,48	7,49	4,92
1125,00	352,81	128,55	59,34	40,67	27,36	8,46	5,75
1140,06	229,81	129,03	44,86	40,20	24,48	8,46	5,01
735,58	394,40	96,07	64,06	34,58	28,53	7,29	5,97
780,18	286,95	101,00	51,77	35,84	25,71	7,51	5,37
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
914,51	297,28	111,18	52,71	37,41	26,31	7,84	5,40
Ucalc = 0*		Ucalc = 0*		Ucalc = 0*		Ucalc = 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004	

(*) $p < 0,01$

3.3. Estereológicos

3.3.1. Epitélio Palatino

Volume Citoplasmático

Analisando-se a tabela 10, onde estão expressos os valores citoplasmáticos das células da camada basal do epitélio palatino, verificou-se que o valor médio para o filhote intoxicado era similar ($86,65 \mu\text{m}^3$) ao do controle ($111,01 \mu\text{m}^3$), não sendo estatisticamente significante o confronto efetuado.

O volume citoplasmático das células da camada espinhosa do epitélio palatino menor ($352,85 \mu\text{m}^3$) quando comparada ao do controle ($461,59^* \mu\text{m}^3$) (tabela 11).

Volume Celular

Quando se analisou a Tabela 10, onde estão expressos os valores do volume células, da camada basal do epitélio palatino, verificou-se um comportamento similar dos dados referentes aos filhotes controles e tratados ($397,85 \mu\text{m}^3$ e $397,99 \mu\text{m}^3$ respectivamente), isto é não significante.

O mesmo pode-se dizer em função das células da camada espinhosa dos filhotes controles e tratados ($1015,20 \mu\text{m}^3$ e $979,05 \mu\text{m}^3$ respectivamente), isto é não eram diferentes significativamente.

Relação Núcleo/Citoplasma

A relação N/C das células da camada basal do epitélio palatino mostrou-se maior no filhote tratado (0,53) em função do controle (0,32*), sendo o confronto estatisticamente significativo (* $p < 0,01$). O mesmo aconteceu com a camada espinhosa (0,29 para o tratado e 0,14* para o controle) (* $p < 0,01$).

Densidade Numérica Celular

O número de células basais/mm³ era idêntico nos dois grupos estudados (2,6 e 2,6 x 10⁶/mm³) (tabela 10). O número de células espinhosas/mm³ era similar nos dois grupos estudados (0,98 x 10⁶/mm³ para o controle e 1,04 x 10⁶/mm³ para o tratado) (tabela 11).

Quando se analisou a densidade numérica do epitélio como um todo, observou-se que a mesma era maior no filhote tratado (3,6 x 10⁶/mm³) quando comparado ao controle (1,2 x 10⁶/mm³ *) (* $p < 0,01$).

Espessura Epitelial

Analisando-se a tabela 10 verificou-se que a espessura da camada basal era significativamente menor (6,88 μm) no filhote intoxicado, quando comparada à do controle (11,17 μm *) (* $p < 0,01$). O mesmo foi observado na camada espinhosa (37,83M para o controle e 13,85* μm para o tratado). (* $p < 0,01$) (tabela 11).

A espessura total do epitélio mostrou-se diminuída no filhote tratado (20,74 μm) em função do controle (54,00 μm *) (* $p < 0,01$) (tabela 12).

Relação Superfície Externa/Camada Basal

A relação superfície externa/camada do epitélio palatino mostrou-se aumentada (2,012) no filhote tratado, em função do controle (0,9560*), sendo o confronto significativo para $\alpha = 0,01$ (tabela 12).

Espessura de Ceratina

Analisando-se a Tabela 12, observando-se que a espessura de ceratina era significativamente menor no filhote intoxicado (12,74 μm) em função do controle (20,93 μm^{**}), e tal diferença era significativa (** $p < 0,05$).

Densidade de Superfície

A densidade de superfície do filhote intoxicado era maior (2,26 mm^2/mm^3) quando comparada à do controle (1,93 mm^2/mm^3 *), e tal diferença era significativa para $\alpha = 0,01$.

Tabela 10. Valores estereológicos médios para os volumes citoplasmáticos (μm^3) e celular (μm^3), relação núcleo/citoplasma, espessura (μm) e densidade numérica celular ($\times 10^6$) da camada basal do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicados pelo etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.

Volume Citoplasmático		Volume Celular		Relação N/C		Espessura da Camada		Dens. Numérica Celular ($\times 10^6$)	
C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
189,16	47,73	453,26	366,93	0,26	0,49	13,31	5,18	2,2	2,7
180,56	18,04	463,43	438,89	0,28	0,43	11,33	9,46	2,2	2,3
33,79	117,99	327,64	320,91	0,43	0,72	9,71	6,77	3,0	3,1
56,46	175,77	355,76	462,26	0,35	0,49	11,08	6,42	2,8	2,2
95,08	73,74	389,18	400,97	0,26	0,52	10,41	6,59	2,6	2,5
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
111,01	86,65	397,85	397,99	0,32	0,53	11,17	6,88	2,6	2,6
Ucalc = 9		Ucalc = 11		Ucalc = 0,5*		Ucalc = 0*		Ucalc = 12	
p U = 0,274		p U = 0,421		p U = 0,006		p U = 0,004		p U = 0,500	

Tabela 11. Valores estereológicos médios para os volumes citoplasmáticos (μm^3) e celular (μm^3), relação núcleo/citoplasma, espessura (μm) e densidade numérica celular ($\times 10^6$) da camada espinhosa do epitélio palatino de ratos controles (C) e intoxicados pelo etanol (T).
Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.

Volume Citoplasmático		Volume Celular		Relação N/C		Espessura da Camada		Dens. Numérica Celular (X106)	
C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
402,13	444,05	920,30	1111,02	0,12	0,27	37,36	17,22	1,1	0,9
507,72	291,67	1012,30	973,65	0,15	0,33	34,99	11,14	1,0	1,0
393,32	306,57	960,90	861,70	0,12	0,28	36,94	12,54	1,0	1,2
547,82	404,71	1114,40	1008,38	0,12	0,27	41,32	18,49	0,9	1,0
456,95	317,24	1068,10	940,50	0,19	0,30	38,51	9,88	0,9	1,1
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
461,59	352,85	1015,20	979,05	0,14	0,29	37,83	13,85	0,98	1,04
Ucalc = 9		Ucalc = 11		Ucalc = 0,5*		Ucalc = 0*		Ucalc = 12	
p U = 0,274		p U = 0,421		p U = 0,006		p U = 0,004		p U = 0,500	

Tabela 12. Valores estereológicos médios da densidade de superfície (mm^2/mm^3), da espessura total do epitélio (μm), da espessura de ceratina (μm), da relação superfície externa e camada basal e densidade numérica (n^0/mm^3) do epitélio total do palato de ratos controles (C) e intoxicados com etanol (T). Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.

Densidade de Superfície		Espessura Total do Epitélio		Espessura de Ceratina		Relação Superfície Externa/Basal		Dens. Numérica (X106)	
C	T	C	T	C	T	C	T	C	T
1,77	2,40	58,99	22,40	13,52	13,89	0,9350	1,949	1,3	3,6
1,91	2,20	61,41	20,60	29,70	15,03	0,8920	2,354	1,2	3,3
2,11	2,10	55,12	19,31	18,87	12,63	1,0090	1,946	1,4	4,3
1,80	2,20	62,31	24,91	19,41	10,45	0,9810	1,815	1,2	3,2
2,05	2,40	57,15	16,46	23,15	11,72	0,9630	1,997	1,0	3,6
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
1,93	2,26	59,00	20,74	20,93	12,74	0,9560	2,012	1,2	3,6
Ucalc = 1*		Ucalc = 0*		Ucalc = 2*		Ucalc = 0*		Ucalc = 0*	
p U = 0,008		p U = 0,004		p U = 0,016		p U = 0,004		p U = 0,004	

3.3.2. Osso Palatino

Densidade de Volume

Analisando-se a tabela 13, onde estão expressos os valores percentuais médios da densidade de volume das trabéculas ósseas calcificadas, dos osteócitos, da medula e do perióstio do osso palatino, verificou-se que os valores para o filhote tratado com etanol eram: 0,4320%, 0,0320%, 0,3645% e 0,1715% respectivamente, enquanto que para o filhote controle eram: 0,6860% *, 0,1025% *, 0,1835% * e 0,0280% * respectivamente. O confronto estatístico mostrou-se significativo para todos os parâmetros estudados (* $p < 0,01$).

Densidade Numérica

Analisando-se a tabela 14, foi possível observar que o número de osteócitos/mm³ era menor no filhote tratado (81706,8/mm³) quando comparado ao controle (86867,2/mm³). Entretanto, quando foi realizado o confronto estatístico verificou-se não ser significativa tal diferença.

Tabela 13. Valores percentuais (%) médios da densidade de volume das trabéculas ósseas calcificadas, osteócitos, medula e perióstio do osso palatino de ratos controles (C) e tratados com etanol (T).
Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.

Volume		Área		Perímetro		Relação V/A	
C	T	C	T	C	T	C	T
0,7150	0,4275	0,0950	0,0250	0,1525	0,3850	0,0375	0,1625
0,7175	0,5125	0,1100	0,0575	0,1725	0,2700	0	0,1600
0,6975	0,3400	0,1175	0,0175	0,1850	0,5175	0	0,1250
0,6850	0,4525	0,1225	0,0350	0,1925	0,3000	0	0,2125
0,6150	0,4275	0,0675	0,0250	0,2150	0,3500	0,1025	0,1975
\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}	\bar{X}
0,6860	0,4320	0,1025	0,0320	0,1835	0,3645	0,0280	0,1715
Ucalc = 0*		Ucalc = 0*		Ucalc = 0*		Ucalc = 0*	
p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004		p U = 0,004	

(*) $p < 0,01$

Tabela 14. Valores estereológicos médios do número de osteócitos/mm³ do osso palatino de ratos controles (C) e tratados com etanol (T).
Teste de Wilcoxon – Mann-Whitney.

Número de Osteócitos/mm ³	
C	T
87598,5	90142,8
72684,7	113579,6
78831,3	62031,9
121687,8	72767,4
73533,6	70012,4
\bar{X}	\bar{X}
0,86867,2	0,181706,8
U _{calc} = 9ns	
p U = 0,274	

(ns) não significante

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Peso Corporal

Os pesos corporais médios dos filhotes utilizados neste trabalho foram iguais a 34,86g para os do grupo de controle e 20,20g para os do grupo tratado com etanol, sendo a diferença significativa.

Já em 1974, Abel⁽¹¹²⁾ observara que animais lactentes, cujas mães bebiam etanol, apresentaram níveis de crescimento significativamente menores que os de controle. No rato após desmame, o etanol provoca redução de peso corporal.⁽¹¹³⁾ Injeções de etanol na camundonga lactante retardavam o nível de crescimento dos seus filhotes.⁽¹¹²⁾ Por outro lado, o etanol consumido pela camundonga lactante na água do bebedouro, não influenciou o nível de crescimento dos filhotes.⁽¹¹²⁾

Oyama *et al.*^(135,136) observaram que a ingestão materna de etanol afetava o desenvolvimento dos filhotes e que tal fato era dose-dependente. Assim, etanol a 10% ou 20% na água do bebedouro causou diminuição no peso corporal do filhote; entretanto etanol a 5% não alterou o peso corporal.

É bem conhecido o fato de o alcoolismo durante a prenhez resultar em deficiência severa no crescimento pré-natal,^(51,147) e muitos estudos mostraram peso corporal diminuído ao nascimento de filhotes de ratas tratadas com álcool.^(148,149) Outros estudos demonstraram que o tratamento crônico com etanol, através do ciclo reprodutivo, induz distúrbios metabólicos importantes nas mães durante a amamentação, incluindo alterações na função da glândula

mamária que leva a uma diminuição na produção total de leite com aumento do conteúdo de lipídios no mesmo.⁽⁵⁸⁾

Epitélio palatino e osso palatino

O epitélio palatino dos filhotes, cujas mães foram tratadas com etanol a 20% na água do bebedouro, mostrou-se mais delgado e constituído de células basais e espinhosas semelhantes aos dos controles com citoplasma menos abundante e núcleos de maior volume. O número de células estava aumentando.

Os dados histométricos confirmam tais observações. A espessura do epitélio total era mais delgada, como também, o era a de ceratina, pois era o mesmo constituído de células mais numerosas ($p < 0,01$) e de menor tamanho (embora não tenha sido significativa a diferença), observadas após o emprego da estereologia. Tal discriminação de espessura epitelial está associada a um aumento da densidade de superfície ($p < 0,01$), como também os volumes citoplasmáticos ($p < 0,05$) e celular (não significativa) reduzidos. Tais fatos não confirmados pelo maior número de células/mm³ no epitélio como um todo ($p < 0,05$). Os núcleos das células da camada basal eram maiores, confirmadas pelos valores aumentados, obtidos cariometricamente, para os diâmetros menor ($p < 0,01$) e médio ($p < 0,05$), área ($p < 0,05$) e relação V/A ($p < 0,05$). Observou-se também modificação da forma nuclear, estando esta mais arredondada. Os núcleos das células da camada espinhosa também eram maiores, após cariometria, para o diâmetro médio ($p < 0,05$), volume ($p < 0,05$) e relação V/A ($p < 0,05$). Não houve alteração de forma nos núcleos das células

da camada espinhosa, de acordo com os valores similares para os parâmetros coeficiente de forma e índice de contorno, obtidos nos dois grupos estudados.

As trabécula ósseas do osso palatino eram mais delicadas, menos calcificadas, com osteócitos de menor tamanho; a medula óssea continha muitos adipócitos.

Os dados estereológicos confirmam estas observações. Percentualmente as trabéculas ósseas apresentam valores menores, como também os osteócitos; a medula óssea mostrou valores maiores ($p < 0,01$). Os osteócitos eram menos volumosos, confirmado pelos valores diminuídos para os diâmetros maior, menor e médio ($p < 0,01$); volume, área, perímetro e relação V/A ($p < 0,01$). O número de osteócitos/mm³ era menor, porém não significante.

Uma explicação razoável para os fatos observados neste trabalho poderia basear-se em dois mecanismos de ação do etanol: uma ação direta nos tecidos e uma ação indireta pela malnutrição que ocorre nestes casos.

Muitos estudos demonstraram que o etanol, ou seu metabólito acetaldeído, altera a síntese protéica, inibindo seu transporte e secreção no fígado.⁽¹⁵⁰⁾ Outros estudos *in vivo* ou *in vitro* indicaram que estes compostos atuam ao nível dos microtúbulos.^(150,151) Esta alteração dos microtúbulos está associada com o acúmulo intracelular de vesículas secretoras e com uma distensão geral das cisternas do retículo endoplasmático.⁽¹⁵²⁾ Embora o fígado seja o órgão principal responsável pela oxidação do etanol, muitas alterações produzidas pela ingestão do etanol foram observadas em outros tecidos (por ex., mal funcionamento do sistema cardiovascular, miopatia alcoólica, etc).⁽¹⁵³⁾

O consumo crônico de etanol altera profundamente a função da glândula mamária normal, como indicado por uma diminuição na produção de leite, e também por uma alteração na composição do mesmo e modificações na estrutura da glândula mamária⁽⁵⁸⁾ com alteração na produção de aminoácidos.⁽¹¹⁵⁾ Além do mais, a presença de etanol e acetaldeído foi demonstrada no leite de ratas tratadas cronicamente com etanol.^(58,116)

Após a ingestão de álcool, o etanol passa para o leite, onde pode ser encontrado em concentrações similares às aquelas encontradas no sangue.^(58,116) Tal fato poderia ser explicado pela falta de atividade do álcool-desidrogenase na glândula mamária.⁽¹¹⁶⁾ Por outro lado, o acetaldeído foi encontrado no leite porém em concentrações menores que aquelas encontradas no sangue. Provavelmente seja devido à alta atividade de acetaldeído-desidrogenase na glândula mamária, embora esta atividade diminua significativamente com o consumo prolongado de etanol.⁽¹¹⁶⁾ Vieram em apoio a esses fatos os resultados obtidos por Vilaró *et al.*⁽¹¹⁹⁾ quando observaram perda de polarização celular da glândula mamária, com redução dos elementos dictiosomais do aparelho de Golgi e anomalias severas em nível de maturação e secreção da caseína, enquanto que síntese e secreção de lipídios não foram alteradas. Os autores observaram que tais alterações eram devidas à ação do etanol e/ou, acetaldeído e não eram devidas à malnutrição associada.

Embora cada grama de etanol possa produzir 29,7Kj, a ingestão de álcool pode induzir malnutrição por três vias diferentes: primeiramente, pela ingestão diminuída de alimentos pelo alcoólatra; segundo, pela digestão e absorção

diminuídas dos alimentos; e terceiro, pelo metabolismo alterado do nutriente.^(154,155)

O aumento na ingestão de alimentos que ocorre com a lactação nas mães controles é pequeno e temporário nas mães tratadas com etanol, produzindo uma perda marcante do peso corporal durante os primeiros 15 dias de lactação. Nestes animais, a produção de leite está provavelmente reduzida como demonstrado em outros estudos de ingestão de álcool nas mães lactantes.^(127,156) A falta de leite disponível para os filhotes de ratas lactantes parece ser o fator principal causador da desnutrição severa, observado por Ludeña *et al.*,⁽¹⁴⁸⁾ em filhotes no 15º dia de vida e manifestada por retardo do crescimento e sua depleção significativa dos estoques de glicogênio hepático. A concentração de corpos cetônicos no sangue destes filhotes estava ligeiramente aumentada, como esperado, devido à degradação aumentada de ácidos graxos produzidos pelo estado sub-nutricional. Esta situação, entretanto, era similar à condição produzida pela inanição prolongada no rato adulto,⁽¹⁵⁷⁾ no qual os níveis circulantes de corpos cetônicos estavam baixos, quando comparado a animais submetidos a períodos curtos de privação de alimento, devido à falta de estoques lipídicos, há uma redução drástica no leite disponível, conhecido por ser a fonte principal de lipídios no rato lactente.^(158,159)

A ingestão continuada de álcool durante a lactação altera a composição química do leite,^(114,115) resultando no aparecimento do etanol e acetaldeído no leite⁽¹¹⁶⁾ e exacerba os efeitos do etanol nos neonatos.⁽⁵⁷⁾ Jones e Steward⁽⁵⁴⁾ observaram o peso das glândulas mamárias diminuído, como também alterações histológicas na gordura e células epiteliais do tecido mamário de

ratas que receberam etanol na água do bebedouro. Tais alterações estruturais podem contribuir para os defeitos funcionais observados nas glândulas mamárias dos animais tratados com etanol.

Utilizando ratos alimentados com dieta pareada contendo etanol ou dieta controle líquida isocalórica ou com dieta poletizada de laboratório, Steven *et al.*,⁽¹¹⁷⁾ observaram, no 2º dia de lactação, animais tratados com etanol por tempo prolongado com diminuição significativa na porcentagem de tecido conectivo, quando comparados aos animais controles pareados e alimentados com ração poletizada. Entretanto, no dia 10 da lactação, não foram observadas alterações em qualquer estrutura glandular. Estes resultados indicaram que o etanol pode alterar a estrutura da glândula mamária durante os primeiros estágios da lactação, mesmo quando são mantidos níveis adequados de proteína dietética.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Tendo por base os resultados obtidos neste trabalho, foi possível concluir que o etanol, administrado na rata durante a lactação, provoca no lactente: diminuição significativa no peso corporal; alterações no epitélio palatino, observadas histologicamente, traduzidas por menor espessura, com as camadas basal e espinhosa também mais delgadas, assim como a camada córnea; os núcleos eram mais volumosos e a lâmina própria estava edemaciada; histologicamente, as trabéculas ósseas eram mais delicadas, menos calcificadas, com osteócitos de menor volume, e a medula continha mais adipócitos.

Morfometricamente foi possível observar:

- núcleos do epitélio palatino mais volumosos, com os da camada basal mais arredondados;
- osteócitos de menor volume.

Estereologicamente foi possível observar: que o epitélio palatino era menos espesso, assim como a camada córnea; a densidade de superfície era maior, as células menores e o número de células por mm³ era maior; o osso palatino apresentou percentualmente trabéculas ósseas diminuídas, como também os osteócitos e maior quantidade de medula.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que lactentes de mães tratadas com etanol a 20% no bebedouro, durante a lactação, apresentaram crescimento pós-natal retardado, com epitélio palatino constituído de células hipotrofiadas e com osso palatino pouco calcificado.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Godde WH, Agarwal DP. Alcoholism of medical and genetics aspects. 1 ed. New York: Pergam Press; 1989.
2. Lieber CS. Metabolism of ethanol, metabolic effects and pathogenesis of injury. *Acta Scand* 1985; Suppl 703:11.
3. Gill K, Amit W, Smith BR. The regulation of alcohol consumption in rats: the role of alcohol metabolizing enzymes catalase and aldehyde dehydrogenase. *Alcohol* 1996; 13(4):347-55.
4. Crawford DW, Balakenhoan DH. Arterial wall oxygenation oxy radicals and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1991; 89:97-108.
5. McDonough KH. Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology* 2003; 189:89-97.
6. Thampi HBS, Manoj G, Leelamma S, Menon VP. Effects of dietary fiber on levels of lipids and lipids peroxides in high fat diet. *Ind Exp Biol* 1991; 39:563-7.
7. Harburg E, Gunn R, Gleiberman L, Di Franceisco N, Schork A. Psychosocial factors, alcohol use, and hangover signs among social drinkers; a reappraisal. *J Cleir Epidemiol* 1993; 46:413-22.

8. Span SA, Earleywine M. Familial risks for alcoholism and hangover symptoms. *Addict Behav* 1999; 24:121-5.
9. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Lipido*. 1u: Harper's Biochemistry. 3^o ed. Connecticut: Appleton e Lange; 1993.
10. National Highway Traffic Safety Administration. *Traffic safety facts 1993: a compilation of motor vehicle crash data from the fatal accident reporting system and the general estimates system*. Washington; 2002.
11. Kandel D, Chen K, Warner LA, Kessler RC, Grant B. Prevalence and demographic correlates of symptoms of last year dependence on alcohol, nicotine, marijuana and cocaine in the U. S. population. *Drug Alcohol Depend* 1997; 44(1):11-29.
12. Grant BF, Dawson DA. Age at onset of alcohol use and its association with DSM. IV Alcohol abuse and dependence: Results from the National Longitudinal Alcohol Epidemiologic Survey. *J Subst Abuse* 1997; 9:103-10.
13. Hoffmann NG, Ninonuevo F, Mozey J, Luxenberg MG. Comparison of court-referred DWI arrestees with other outpatients in substance abuse treatment. *Stud Alcohol* 1987; 48:591-4.

14. Veazie MA, Smith GS. Heavy drinking, alcohol dependence, and injuries at work among young workers in the United States labor force. *Alcohol Clin Exp Res* 2000; 24(12):1811-9.
15. Wechsler H, Kasey EH, Thum D, Demone HW. Alcohol level and home accidents. *Public Health Rep* 1969; 84(12):1043-50.
16. Stephens CJ. Alcohol consumption and casualties: Drinking in the event. *Drug Alcohol Depend* 1987; 20(2):115-27.
17. Trent RB. Emergency room evidence on the role of alcohol intoxication injury at work in the U.S. *Safety Science* 1991; 14:241-52.
18. Cherpitel CJ, Pares A, Rodes J, Rosovsky H. Drinking in the injury event: A comparison of emergency room population in the United States, Mexico and Spain. *Int J Addict* 1993; 28:931-45.
19. Presley CA, Meilman PWL, Yerla R. Alcohol and drugs on American college campuses: Use, consequences, and perceptions of the campus environment. 2 ed. Carbondale: Southern Illinois University; 1995.
20. Johnston LD, O'Malley PM, Bachman JG. National survey results on drug use from the Monitoring the Future Study, 1975-1994: College students and young adults. 2 ed. U.S: Rockville – Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; 1996.

21. Meilman PW, Presley A, Cashin M. Average weekly alcohol consumption: Drinking percentiles for American college students. *J Am Coll Health* 1997; 45(5):201-4.
22. Wechsler H, Da Venport A, Dowdall G, Moeykends M, Castillos S. Health and behavioral consequences of binge drinking in college: A national survey of students at 140 campuses. *J Am Med Assoc* 1994; 272(21):1672-7.
23. Engs RC, Diebold BA, Hanson DJ. The drinking patterns and problems of a national sample of college students: 1994. *J Alcohol Drug Educ* 1996; 41(1):13-33.
24. Koss MP, Gidycz CA, Wisniewski N. The scope of rape: Incidence and prevalence of sexual aggression and victimization in a national sample of higher education students. *J Consue Clin Psychol* 1987; 55(2):162-170.
25. Norris J, Nurius PS, Dimeff L. A Through her eyes: perception of and resistance to acquaintance. *Psychol Women Quarterly* 1996; 20(1):123-45.
26. Wood JM. Predicting academic problems in college from freshman alcohol involvement. *J Stud Alcohol* 1997; 58:200-10.

27. Engs RC, Hanson DJ. The drinking - patterns and problems of college students: 1983. *Alcohol Drug Educ* 1985; 31(1):65-82.
28. Engs RC, Hanson DJ. Gender differences in drinking patterns and problems among college students: A review of the literature. *Alcohol Drug Educ* 1996; 35(1):36-47.
29. Strunin L, Hingson R. Alcohol, drugs, and adolescent sexual behavior. *Int J Addic* 1992; 27(2):129-46.
30. Donovan C, McEwan RA. A review of the literature examining the relationship between alcohol use and HIV -related sexual risk-taking in young people. *Abingdon* 1995; 90(3):319-28.
31. Campbell KE, Zobeck TS, Bertolucci D. Trends in alcohol - related fatal traffic crashes, United States, 1977-1993 (Surveillance Report No. 34). Rockville: U. S. Department of Health and Human Services; 1995.
32. O'Hare TM. Drinking in college: Consumption patterns, problems sex differences and legal drinking age. *J Stud Alcohol* 1990; 51(6):536-41.
33. Baer JS, Kivlahan DR, Marlatt G. A High-risk drinking across the transition from high school to college. *Alcohol Clin Exp Res* 1995; 19(1):54-61.

34. Zucker RA, Fitzgerald HE. Early developmental factors and risk for alcohol problems. *Alcohol Health Res World* 1991; 15(1):18-24.
35. Jessor R, Donovan JE, Costa FM. *Beyond adolescence: problem behavior and young adult development*. New York: Cambridge University Press; 1991.
36. Bongers IM, Van Oers HA, Van de Goor IA, Garretsen HF. Alcohol use and problem drinking: prevalences in the general Rotterdam population. *Subst Use Misuse* 1997; 32(11):1491-512.
37. Hochgraf PB, Zilberman ML, Andrade AG. Women alcoholics – social, demographic and clinical characteristics in a Brazilian sample. *Alcohol and Alcoholism* 1995; 30(4):427-32.
38. Mello NK, Mendelson JH, Teoh SK. Neuroendocrine consequences of alcohol abuse in women. *Ann NY Acad Sci* 1989; 562:211-40.
39. Pettersson P, Ellsinger BM, Sjoberg C, Bjorntorp P. Fat distribution and steroid hormones in women with alcohol abuse. *J Intern Med* 1990; 228(4): 311-6.
40. Eriksson CJ, Fukunaga T, Sarkola T. Estrogen-related acetaldehyde elevation in women during alcohol intoxication. *Alcohol Clin Exp Res* 1996; 20(7):1192-5.

41. Burton R. (Printed under "Democritus Jr."): The Anatomy of Melancholy. In: Krous HF, editor. Fetal Alcohol Syndrome: A dilemma of maternal. 16 Ed. London: Willian Tegg; 1981.
42. Lemoine P, Harousseau H, Borteyru JP, Menuet JC. Les enfants de parents alcooliques: Anomalies observées à propôs de 127 cas. *Quest Med* 1968; 25:476.
43. Jones KL, Smith DW, Uilleland CN, Streissguth AP. Pattern of malformations in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet* 1973; 1(7815):1267-71.
44. Jones KL, Smith DW. The fetal alcohol syndrome. *Teratology* 1976; 12(1):1-10.
45. Clarren SK, Smith DW. The fetal alcohol syndrome. *N Eng J Med* 1978; 298(19):1063-7.
46. Hanson JW, Jones KL, Smith DW. Fetal alcohol syndrome. Experience with 41 patients. *JAMA* 1976; 235(14):1458-60.
47. Peiffer J, Majewzki F, Fishbeck H, Bierich JR, Volk B. Alcohol embryo and fetopathy. Neuropathology of 3 children and 3 fetuses. *J Neurol Sci* 1979; 41(2):125-37.

48. DeBeubelaer MM, Randall CL, Strand DR. Renal Abnormalities in a child with fetal alcohol syndrome. *J Pediatric* 1977; 91(5):759-60.
49. Goldstein G, Arulanantham K. Neural tube defect and retal abnormalities in a child with fetal alcohol syndrome. *K Pediatr* 1978; 93(4):636-7.
50. Shorey RL, Terranella PA, Shive W. Effects of ethanol on growth, consumption of food, and body composition of weanling rats. *J Nutr* 1977; 107(4):614-20.
51. Detering N, Reed WD, Ozand PT, Karahasan A. The effects of maternal ethanol consumption in the rat on the development of their offspring. *J Nutr* 1979; 109(6):999-1009.
52. Abel EL, Greizerstein HB. Ethanol-induced prenatal growth deficiency: changes in fetal body composition. *J Pharmacol Exp Ther* 1979; 211:668-71.
53. Tenbrinck WS, Buchin SY. Fetal alcohol syndrome. Report of a case. *Jama* 1975; 232(11):1144-7.
54. Jones WL, Stewart DB. Effects of orally-administered ethanol on mammary gland morphology and functional efficiency in lactating rats. *Exp Pathol* 1984; 25(4):205-13.

55. Coiro V, Alboni A, Gramellini D, Cigarini C, Bianconi L, Pignatti D, *et al.* Inhibition by ethanol of the oxytocin Response to breast stimulation in normal women and the role of endogenous opioids. *Acta. Endocrinol* 1992; 126:213-6.
56. Chalkley HW. Method for quantitative morphologic analysis of tissues. *J Nat Cancer Inst* 1943; 4:47-53.
57. Guerri C, Esquifino A, Sanchis R, Grisolia S. Growth, enzymes and hormonal changes in offspring of alcohol-fed rats, in *Mechanisms of Alcohol Damage in Utero*. Ciba Foundation Symposium 1984; 105:85-102.
58. Vilaró S, Viñas O, Remesar X, Herrera E. Effects of chronic ethanol consumption on lactational performance in rat: mammary gland and milk composition and pups growth and metabolism. *Pharmacol Biochem Behav* 1987; 27(2):333-9.
59. Tavares-do-Carmo MG, Nascimento-Curi CMO. Effect of ethanol intake during lactation on the metabolism of dams and on pup development. *Braz J Med Biol Res* 1990; 23(111):1161-3.
60. Volpi R, Chiodera P, Gramellini D, Cigarini C, Papadia C, Caffari G, *et al.* Endogenous opioid mediation of the inhibitor effect of ethanol on the prolactin response to breast stimulation in normal women. *Life Sci* 1994; 54:739-44.

61. Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS. Alcohol and breast cancer in women: a pooled analysis of cohort studies. *JAMA* 1998; 279(7):535-40.
62. Kronick JB. Teratogenic effects of ethyl alcohol administered to Mice. *Am J Obstet Gynec* 1976; 124(7):676-80.
63. Chernoff GF. The fetal alcohol syndrome in mice: an animal model. *Teratology* 1977; 15(3):223-9.
64. Randall CL, Taylor WJ, Walker DW. Ethanol induced malformations in mice. *Alcoholism Clin Exp Res* 1977; 1(2):219.
65. Randall CL, Taylor WJ. Prenatal ethanol exposure in mice: teratogenic effects. *Teratology* 1979; 19(3):305-11.
66. Ellis FW, Pick JR. An animal model of the fetal alcohol syndrome in beagles. *Alcohol Clin Exp Res* 1980; 4(2):123-34.
67. Sandor S, Elias S. The influence of aethyl-alcohol on the development of the chick embryo 11. *Rev Roum Embryol Cytol* 1968; 5:167.
68. Pilstrom L, Kiessling KH. Effect of ethanol on the liver and brain mitochondrial functions of the offspring of rats. *Acta Pharm Toxicol* 1967; 25(2):225-32.

69. Tze WJ, Lee M. Adverse effects of maternal alcohol consumption on pregnancy and fetal growth in rats. *Nature* 1975; 257(5527):479-80.
70. Henderson GT, Schenker S. The effect of maternal alcohol consumption on the viability and visceral development of the newborn rat. *Res. Comm. Chem. Path. Pharmacol* 1977; 16(1):15.
71. Oisund JF, Fjorden AF, Morlund J. Is moderate ethanol consumption teratogenic in the rat. *Acta Pharm Toxicol* 1978; 43(2):145-55.
72. Lochry EA, Shapiro NR, Riley EP. Growth deficits in rats exposed to alcohol in utero. *J Stud Alcohol* 1980; 41:1031.
73. Brown NA, Gouding EH, Fabro S. Ethanol embryotoxicity: direct effects on mammalian embryos in vitro. *Science* 1980; 206:573-5.
74. Scott WJ Jr, Fradkin R. The effect of prenatal ethanol in cynomolgus monkeys. *Teratology* 1984; 29(1):49-56.
75. Mclain DE, Roe DA. Fetal alcohol syndrome in the ferret (*Mustela putorius*). *Teratology* 1984; 30(2):203-10.
76. Schwetz BA, Smith FA, Staples RE. Teratogenic potential of ethanol in mice, rats and rabbits. *Teratology* 1978; 18(3):385-92.

77. Papara-Nicholson D, Telford IR. Effects of alcohol on reproduction and fetal development in the guinea pig. *Anat Rec* 1957; 127(3):438.
78. Dexter JD, Tumbleson ME, Decker JD, Middleton CC. Fetal alcohol syndrome in Sinclair (S-1) miniature swine. *Alcoholism Clin Exp Res* 1980; 4:146.
79. Rosman NP, Malone MJ. An experimental study of the fetal alcohol syndrome. *Neurology* 1976; 26:365.
80. Sandor S, Amels D. The action of ethanol on the prenatal development of albino rats. *Rev Roum Embryol Cytol* 1971; 8:105.
81. Boggan WO, Randall CM. Renal anomalies in mice prenatally exposed to ethanol. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1979; 23:127.
82. Abel EL. Effects of ethanol on pregnant rats and their offspring. *Psychopharmacology* 1978; 57:5.
83. Root AW, Reiter EO, Andriola M, Duckett G. Hypothalamic – pituitary function in the fetal alcohol syndrome. *J Pediatr* 1975; 87(4):585-8.
84. Abel EL, Dintcheff BA. Effects of prenatal alcohol exposure on growth and development in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1978; 207(3): 916-21.

85. Leichter J, Lee M. Effect of maternal ethanol administration on physical growth of the offspring in rats. *Growth* 1979; 43(4):288-93.
86. Gilman MR. A preliminary study of the teratogenic effects of inhaled carbon tetrachloride and ethyl alcohol consumption in the rat. [Tese] Drexel Institute of Technology Univ. Microfilms: Ann Arbor Michigan; 1978.
87. Beauchemin RR, Gartner LP, Provenza DV. Alcohol induced cardiac malformations in the rat. *Anat Anz* 1984; 155(1-5):17-28.
88. Dupuis C, Dehaene P, Deroubaix-Tella P, Blancgarin AP, Rey C, Carpentier-Couraut C. Les cardiopathies des enfants nes de mère alecolique. *Arch Mal Coeur* 1978; 71(5):565-72.
89. Loser H, Majewski F. Type and frequency of cardiac defects in embryofetal alcohol syndrome. Report of 16 cases. *Br Heart J* 1977; 39:1374-9.
90. Sandor G, Smith DF, McLeod PM. Cardiac malformations in the fetal alcohol syndrome. *J Pediatr* 1981; 98(5):771-3.
91. Abel EL. Fetal aleohol syndrome and letal aleohol effects. New York: Plenum Press; 1964.

92. Randall CL, Riley EP. Prenatal alcohol exposure: Current issues and the status of animal research. *Neurobehav Toxicol Teratol* 1981; 3(2):111.
93. Sulik KK, Johnston MC, Webb MA. Fetal alcohol syndrome: embryogenesis in a mouse model. *Science* 1981; 214(4523):936-8.
94. Sulik KK, Johnston MC. Sequence of development alterations following acute ethanol exposure in mice: Craniofacial features of the Fetal Alcohol Syndrome. *Am J Anat* 1983; 166(3):257-69.
95. Sulik KK, Lauder LM, Dehart DB. Brain malformations in prenatal mice following acute maternal ethanol administration. *Int J Dev Neurosci* 1984; 2:203.
96. Webster WS, Germaln MA, Lipson AW, Alsh D. Alcohol and congenital heart defects: An experimental study in mice. *Cardiovas Res* 1984; 18:335-8.
97. Daft PA, Johnston MC, Sulik KK. Abnormal heart and great vessel development following acute ethanol exposure in mice. *Teratology* 1986; 33(1):93-104.
98. Steeg GN, Woolf P. Cardiovascular malformations in fetal alcohol syndrome. *Am Heart J* 1979; 98(5):635-7.

99. Streissguth AP, Dwyer SL, Martin LC, Smith DW. Teratogenic effects of alcohol in humans and laboratory animals. *Science* 1980; 209(4454):353-61.
100. Uphoff C, Nyquist B, Toth R. Cardiac muscle development in mice exposed to ethanol in utero. *Teratology* 1984; 30(1):119-29.
101. Krous HF. Fetal alcohol syndrome: A dilemma of maternal alcoholism *Pathol Annu* 1981; 16(1):295-311.
102. Fuster JS, Guell S, Cahuana AB, Garcia-Tornel S. Neural tube defects and fetal alcohol syndrome. *J Pediatr* 1979; 95(2):328-9.
103. Sherwin B, Jacobson S. A rat model for the fetal alcoholic syndrome. *Alcohol Clin Exper Res* 1979; 3(2):195.
104. Thadani PV, Lau C, Slotkin TA, Schanberg SM. Effects of maternal ethanol ingestion on amine uptake into synaptosomes of fetal and neonatal rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1977; 200(2):292-7.
105. Nakamura K, Suzuki A. Experiments concerning congenital malformations of the encephalon induced by certain agents (study performed on the Wistar rats fetus). *Arch Anat Path* 1967; 15(2):116-21.

106. Rawat AK. Ribossomal protein synthesis in the fetal rat brain as influenced by maternal ethanol consumption. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1975; 12(3):723.
107. Branchey L, Friedhoff AJ. The influence of ethanol administered to pregnant rats on tyrosine hydroxylase activity of their offspring. *Psychopharmacology* 1973; 32:151-6.
108. Vicent NM. The effects of prenatal alcoholism upon motivation, emotionality and learning. *Amer Psychologist* 1958; 13(5):401.
109. Aurox M, Dehaupas M. Influence de la nutrition de la mere sur le développement tardif dur système nerveux central de la progeniture. *C R Soc Biol* 1970; 161(6):1432-6.
110. Mala Campos G. Estudo morfológico e morfométrico das malformações induzidas no feto do rato pelo consumo materno de álcool durante a gestação. Relatório à Comissão Especial de Regime de Trabalho-CERT. São Paulo: USP; 1987
111. Short RV. Breast feeding. *Sci Am* 1984; 250(4):23-9.
112. Abel EL. Alcohol ingestion in lacting rats: effects on mother and offspring. I *Arch Int Pharmacoclyn* 1974; 210:121-7.

113. Wallgren H, Ahlqvist J, Ahman K, Suomalainen H. Repeated alcoholic intoxication compared with continued consumption of dilute ethanol in experiments with rats on a marginal diet. *Brit J Nutr* 1967; 21:643-60.
114. Sanchis R, Guerri C. Chronic ethanol intake in lactating rats: Milk analysis. *Comp Biochem Physiol* 1986; 85(1):107-10.
115. Viñas O, Vilaró S, Herrera E, Remesar X. Effects of chronic ethanol treatment on amino acid uptake and enzyme activities in the lactating rat mammary gland. *Life Sci* 1987; 40:1745-9.
116. Guerri C, Sanchis R. Alcohol and acetaldehyde in rat's milk following ethanol administration. *Life Sci* 1986; 38:1543-56.
117. Steven WM, Bulloch B, Seelig Jr. LL. A morphometric study of the effect of ethanol consumption on lactating mammary glands of rats. *Alc Clin Exp Res* 1989; 13(2):209-12.
118. Tavares-do-Carmo MG, Nascimento-Curi CMO, Martin-Hidalgo A, Herrera E. Effects of ethanol intake on lipid metabolism in the lactating rat. *Alcohol* 1996; 13(5):443-8.
119. Vilaró S, Vinas O, Remesar X. Altered ultrastructure of lactating rat mammary epithelial cells induced by chronic ethanol ingestion. *Alcohol Clin Exp Res* 1989; 13(1):128-36.

120. Subramanian MG, Abel EL. Alcohol inhibits suckling- induced prolactin release and milk yield. *Alcohol* 1988; 5(2):95-8.
121. Subramanian MG, Chen XG, Bergeski BA. Inhibitory effect of alcohol (EtOH) on suckling-induced prolactin release in lactating rats: Site of action. *Biol Reprod* 1991; 44(Suppl):102.
122. Subramanian MG, Savoy-Moore RT. Alcohol and endocrine function: Effects on prolactin release. In: Kochupillai N, Editor. *Adv Endocrinol Metab Diabetes* 1992; 1:191-201.
123. Subramanian MG. Effects of chronic alcohol administration on lactational performance in the rat. *Alcohol* 1995; 12(2):137-43.
124. Fuchs AR, Wagner G. Effect of alcohol and release of oxytocin. *Nature* 1963; 198(4875):92-4.
125. Fuchs AR. Ethanol and inhibition of oxytocin release in lactating rats. *Acta Endocrinol* 1969; 62:546-54.
126. Wagner G, Fuchs AR. Effect of ethanol on uterine activity during suckling in Post-partum women. *Acta Endocrinol* 1968; 58(1):133-41.
127. Cobo E. Effect of different doses of ethanol on the milk-ejecting reflex in lactating Women. *Am J Obstet Gynecol* 1973; 15(6):817-821.

128. Subramanian MG. Evaluation of lactational parameters after alcohol administration for four days during early or midlactation in the rat. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21(5):799-803.
129. Heil HH, Hungund BL, Zheng ZH, Jen KLC, Subramanian MG. Ethanol and lactation: effects on milk lipids and serum constituents. *Alcohol* 1999; 18(1): 43-48.
130. Tavares-do-Carmo MG, Oller-do-Nascimento CM, Martin A, Herrera E. Ethanol intake during lactation impairs milk production in rats and affects growth and metabolism of suckling pups. *Alcohol* 1999; 18(1):71-6.
131. Little RE, Anderson KW, Ervin CH, Worthington RB, Clarren SK. Maternal alcohol use during breast-feeding and infant mental and motor development at one year. *N Engl J Med* 1989; 321(7):425-30.
132. Mennella JA, Beauchamp GK. Beer, breast feeding, and folklore. *Dev Psychobiol* 1993; 26:459-66
133. Auerbach KG, Blume S, Schreiber JR, Falkner F. Beer and the breast-feeding mom. *JAMA* 1987; 258:2126-31.
134. Albuquerque KT, Ramalho RA, Soares AG, Tavares-do-Carmo MG. Effects of ethanol intake on retinol concentration in the milk of lactating rats. *Bras J Med Biol Res* 1998; 31:929-32.

135. Oyama LM, Couto RC, Couto GEC, Dâmaso AR, Oller-do-Nascimento CM. Ethanol intake during lactation I. Effects on dams metabolism and pups body weight gain. *Alcohol* 2000; 21(3):195-200.
136. Oyama LM, Couto RC, Couto GEC, Dâmaso AR, Oller-do-Nascimento CM. Ethanol intake during lactation II. Effects on pups liver and brain metabolism. *Alcohol* 2000; 21(3):201-6.
137. Heil HH, Subramanian MG. Chronic alcohol exposure and lactation. Extended observations. *Alcohol* 2000; 21(2):127-32.
138. Diaz J, Samson H. Impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol. *Science* 1980; 208:751-3.
139. Boorman GA, Morgan KT, Uriah LC. Nose, larynx, and trachea. In: Boorman GA, editor. *Pathology of the fischer rat*. San Diego: Academic Press; 1990. p.315-37.
140. Sala MA, Komesu MC, Lopes RA, Maia Campos G. Karyometric study of basal cell carcinoma. *Braz Dental J* 1994; 5(1):11-14.
141. Merz WA. Die Strekenmessung an gerichteten Strukturen in Mikroskop und Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen volumen relationen im Knochengewebe. *Mikroskopie* 1968; 22(5):132-42.

142. Delesse MA. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *Annales des Mines* 1848; 13:379-88.
143. Weibel ER. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Review Cytology* 1969; 26:235-302.
144. Henning A. Fehler der Oberflächenbestimmung von Kernen bei Endlicher Schnitt dick. *Mikroskopie* 1957; 12(1-2):7-11.
145. Sala MA, Lopes RA, Matheus M. Método morfológico para análise quantitativa de los tejidos. Determinacion de los parâmetros normalis para el hepatocito de rata. *Arc Facultad Med Zaragoza* 1992; 32(1):29-31.
146. Tomkeieff SI. Linear intercepts, areas and volumes. *Nature* 1945; 155(3923):24.
147. Weiner SG, Shoemaker WJ, Koda LY, Bloom FE. Interaction of ethanol and nutrition during gestation: Influence on maternal and offspring development in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 216(3):572-9.
148. Ludeña MC, Mena MA, Salinas M, Herrera E. Effects of alcohol ingestion in the pregnant rat on daily food intake, offspring growth and metabolic parameters. *Gen. Pharmac* 1983; 14(3):327-32.

149. Testar X, Llobera M, Herrera E. Comparative metabolic effects of chronic ethanol intake and under nutrition in pregnant rat and their fetuses. *Alcoholism Clin Exp Res* 1988; 12(2):197-200.
150. Baraona E, Finkelman F, Lieber CR. Reevaluation of the effects of alcohol consumption on rat liver microtubules. *Res. Commun Chem Pathol Pharmacol* 1984; 44(2):265-78.
151. Matsuda Y, Baraona E, Slaspuro M, Lieber CS. Effects of ethanol on liver microtubules and Golgi apparatus. Possible role in altered hepatic secretion of plasma proteins. *Lab Invest* 1979; 41(5):455-63.
152. Feldman G, Maurice M. Morphological findings of liver protein synthesis and secretion. In: Hopper H, Bianchi L, Reutter W, Editores. *Membrane alterations as basis of liver injury*. Lancaster Med Tech Publ 1977; 61-76.
153. Klatsky AL. The relations of alcohol and the cardiovascular system. *Annu Rev Nutr* 1982; 2:51-71.
154. Lieber CS. Interactions of alcohol and nutrition introduction to a symposium. *Alcohol Clin Exp Res* 1983; 7(1):2-4.
155. Testar X, López D, Llobera M, Herrera E. Ethanol administration in the drinking fluid to pregnant rats as a model for the fetal alcohol syndrome. *Pharmacol Biochem Behav. Trrytown* 1986; 24(3):625-30.

156. Rosset HL. Clinical pharmacology of the fetal alcohol syndrome. In: Majchrowics E, Noble EP, editores. *Biochemistry and Pharmacology of Ethanol*. New York: Plenum Press; 1979.
157. Herrera E, Freinkel N. Interrelationships between liver composition, plasma glucose and ketones, and hepatic acetyl CoA and citric acid during prolonged starvation in the male rat. *Biochim Biophys Acta* 1968; 170:244-53.
158. Dymska HA, Czajka DM, Miller SA Influence of artificial diet on weight gain and body composition of the neonatal rat. *J Nutr* 1964; 84(2):100-6.
159. Aranda A, Blázquez E, Herrera E. Liver components, blood glucose and ketone bodies in fed and starved suckling rats. *Horm Metab Res* 1973; 5:350-5.