

EXPOSIÇÃO CRÔNICA A ETANOL: EFEITO CITOTÓXICO SOBRE O EPITÉLIO LINGUAL DE CAMUNDONGOS, AVALIADO PELA EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA

TALITA FRANCO¹

DANILO SALETI FRANÇA²

BIANCA CAROLINE SILVA³

MARCUS VINÍCIOS CAIXETA⁴

PAULO ROGÉRIO DE FARIA⁵

ADRIANO MOTA LOYOLA⁶

SÉRGIO VITORINO CARDOSO⁷

- **Resumo:** *Bebidas alcoólicas associam-se a efeitos carcinogênicos diretos sobre o epitélio bucal, comportando-se potencialmente como mutagênicas a partir da geração mais intensa de radicais livres. A fim de se obter mais informações sobre a participação do álcool na carcinogênese bucal, bem como dos efeitos dessa substância em outros órgãos, propusemos um modelo experimental buscando avaliar as alterações provocadas pelo consumo crônico de álcool sobre a mucosa bucal. Foram utilizados camundongos C57BL/6, cepa caracterizada pela possibilidade de grande consumo de etanol e que, após período de adaptação, foram submetidos à exposição às soluções alcoólicas de concentrações 15% e 40%, durante 6 ou 12 meses, buscando mimetizar variação de concentração e período de exposição que são considerados importantes para a espécie humana. Houve maior consumo de etanol nos grupos expostos a uma dieta com maior concentração alcoólica. A marcação da expressão da metalotioneína, entre os grupos expostos às soluções de etanol, não revelou diferenças significativas. O mesmo aconteceu quando comparados estes grupos expostos ao etanol com o grupo controle, não havendo também diferenças*

¹ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia. Av. Pará, 1720, CEP 38400-902, Uberlândia, MG. talitafrc@yahoo.com.br

² Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia. dansafraca@terra.com.br

³ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia. biancacs01@yahoo.com.br

⁴ Curso de Biomedicina, Universidade Presidente Antônio Carlos. marcaocaixeta@hotmail.com

⁵ Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia. fariapr@yahoo.com.br

⁶ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia. adrianol@hc.ufu.br

⁷ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia. cardososv@gmail.com

quantitativas significantes entre todos os grupos estudados. A aparente inexistência de diferenças entre os grupos avaliados sugere que o efeito carcinogênico do etanol sobre a mucosa oral pode não estar relacionado diretamente ao estresse oxidativo. Por outro lado, ganham força outras conseqüências do consumo crônico de etanol, tais como a desnutrição protéico-calórica e o aumento de permeabilidade das membranas celulares, que podem desempenhar papel mais significativo que a formação de radicais livres.

Palavras-chave: *Álcool, câncer, mucosa bucal, modelo experimental, carcinogênese.*

1. INTRODUÇÃO

Substâncias contendo álcool, especialmente bebidas contendo etanol oriundo de fontes variadas, são amplamente consumidas em praticamente todas as sociedades ocidentais, incluindo o Brasil. O abuso agudo de tais bebidas é associado a alterações comportamentais graves, as quais são tão importantes enquanto fonte de acidentes de trânsito que medida governamental restringiu fortemente o consumo por motoristas no país (Lei 11.705/2008). Por outro lado, talvez até mais importante, dados epidemiológicos são muito claros ao mostrar a associação do consumo crônico de bebidas alcoólicas com a etiopatogênese de doenças crônico-degenerativas, especialmente do sistema digestório, cardiovasculares, neurológicas e câncer (Klatsky et al., 2007; Pöschl e Seitz, 2004; Cunningham et al., 2000), caracterizando

definitivamente esse comportamento como problema de Saúde Pública. Nesse sentido, estima-se que o consumo de álcool tenha sido responsável por mais de 1.500.000 mortes em todo o mundo, no ano 2000, resultando em medidas restritivas tomadas por diversos países (Baumberg e Anderson, 2008; Boffetta e Hashibe, 2006).

Especial interesse tem ocorrido na interação entre o consumo de etanol e câncer (Boffetta e Hashibe, 2006; Pöschl e Seitz, 2004). O consumo crônico de álcool é o fator etiológico preponderante na carcinogênese hepática (McKillop e Schrum, 2005), havendo ainda fortes evidências de sua associação com o surgimento de neoplasias malignas de todo o trato aerodigestivo superior, cólon e reto (Hashibe et al., 2007), bem como de que o álcool pode contribuir para formação de câncer em órgãos tais como mama e pâncreas (Dumitrescu e Shields, 2005; Go et al., 2005). A maior parte do possível

efeito carcinogênico do etanol parece relacionar-se ao seu produto metabólico, o acetaldeído. Outras possíveis contribuições do etanol à carcinogênese incluem aumento da produção de estrógenos, solvência de membranas celulares, produção de radicais livres, alterações no metabolismo do ácido fólico, dano direto pelo etanol ao DNA, deficiências nutricionais e imunológicas (Boffetta e Hashibe, 2006; Pöschl e Seitz, 2004; Howie et al., 2001). Muito recentemente, tem sido mostrado que fatores genéticos podem modificar grandemente a susceptibilidade à carcinogênese alcoólica, em especial por modificar a velocidade de formação e destruição do acetaldeído (Boffetta e Hashibe, 2006).

O consumo crônico de álcool tem sido comumente descrito como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de lesões cancerizáveis e malignas da mucosa bucal (Ide et al., 2008; Hashibe et al., 2007; Doll et al., 1999). Além desse fato, sabe-se, também a partir de investigações populacionais, que o risco relativo para a formação do carcinoma epidermóide de boca é proporcional à frequência diária, à concentração de etanol e à duração do consumo de bebidas alcoólicas (Gillison, 2007). Biologicamente, soluções etanólicas causam aumento da proliferação epitelial, e

também estão associadas a efeitos carcinogênicos diretos sobre as células epiteliais da boca, dentre outros tecidos (Maito et al, 2003). Tais efeitos são representados pela geração de espécies reativas de oxigênio (radicais livres), incluindo íons superóxido, radicais hidroxila, e ainda derivados de peroxidação lipídica, que podem ligar-se ao DNA na forma de adutos e, assim, dar origem a pareamento errôneo durante o processo de duplicação genômica, comportando-se potencialmente como mutagênicos (Visapaa et al, 2004). As espécies reativas do oxigênio são consideradas subprodutos normais do metabolismo. Não obstante, a intensidade de sua formação pode ser modificada por diversas formas de estresse celular, tal como na exposição crônica ao álcool, e o conseqüente incremento de sua concentração pode danificar componentes vitais das células (Cahill et al., 2002). Em particular, o DNA é um dos alvos mais sensíveis, havendo a formação de grande quantidade de bases modificadas mediante ataque oxidativo. Entretanto, a despeito da constante observação epidemiológica da associação entre consumo crônico de bebidas alcoólicas e o câncer bucal, são ainda muito poucos os estudos que abordem isoladamente o efeito biológico do etanol sobre o metabolismo, diferenciação e atividade proliferativa do

epitélio da mucosa bucal. Estudos experimentais, que permitem melhor controle da exposição a esse fator de risco são ainda mais escassos, com avaliação insuficiente de possíveis alterações moleculares das células expostas (Maito et al., 2003; Born et al., 1996; Maier et al., 1994; al-Damouk, 1993).

As metalotioneínas compõem uma classe de proteínas intracelulares não-enzimáticas, de baixo peso molecular, e ricas em cisteína (Leyshon-Sorland, 1993). Sua principal função parece relacionar-se ao controle da disponibilidade intracelular de zinco; sendo ainda associada à neutralização intracelular de compostos tóxicos, em especial de metais pesados e radicais livres e à inibição da apoptose (Haq, Mahoney e Koropatnik, 2003). Estudos baseados em modelos experimentais e observações *in vivo* mostraram uma associação entre a metalotioneína e funções protetoras contra a carcinogênese. Entretanto, a superexpressão dessa proteína tem sido vinculada a comportamentos mais agressivos de neoplasias malignas, levando a um pior prognóstico aos pacientes portadores de tais lesões. Nesse sentido, dados experimentais sugeriram que a indução de superexpressão da metalotioneína estaria associada não a funções protetoras, mas à imobilização de

grandes quantidades de zinco, deixando de liberar o metal a enzimas e fatores de transcrição que dele dependem. Existem poucos estudos que avaliam a expressão imunistoquímica de metalotioneína na carcinogênese oral e ainda, sobre a associação entre o uso crônico de etanol e a expressão da metalotioneína nos tecidos orais (Cherian, Jayasurya e Bay, 2003).

Tendo em vista o interesse particular do presente grupo de pesquisa, bem como de numerosa comunidade científica, de melhor compreender como bebidas alcoólicas contribuem ou até mesmo causam o surgimento de câncer bucal, e em especial considerando a necessidade de obtenção de material biológico a ser utilizado em análises moleculares mais complexas, propusemos o delineamento de um modelo experimental que mimetizasse a variação no nível e na duração de consumo de etanol observado em humanos, relatando-o no presente artigo e discutindo com modelos similares já apresentados pela literatura. Além disso, propusemos estudar o epitélio lingual de camundongos cronicamente submetidos à ingestão de etanol, comparando ao de animais não expostos ao consumo de álcool, para verificar possíveis diferenças entre a espessura epitelial e a expressão

imunoistoquímica da metalotioneína nesse tecido.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo de estudo aqui relatado foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais de nossa Instituição, e constitui parte de uma linha de pesquisa que tem por objetivo avaliar a importância da formação de radicais livres e de adutos ao DNA, provocados pelo álcool, na carcinogênese de língua.

Foram empregados trinta camundongos C57BL/6, descritos como susceptíveis ao consumo de álcool (Yoneyama et al., 2008) (CEMIB / UNICAMP, Campinas, Brasil). Os animais tinham entre 8 e 12 semanas de idade no começo do estudo e pesavam 29,5 gramas em média (variando entre 23,6 e 35,4 gramas). Foram colocados em gaiolas de policarbonato, em grupos de cinco, separados aleatoriamente, e mantidos em ambiente ventilado, com temperatura controlada ($22\pm 1^\circ\text{C}$) e ciclos de claro/escuro de 12/12 horas, com acesso livre a água e ração apropriada (Nuvilab/CR1, Nuvital Nutrients LTDA, Brasil).

Após dez dias de ambientação, vinte animais foram submetidos a períodos sequenciais de adaptação à ingestão alcoólica, utilizando-se solução de sacarose (leite condensado a 4,5%), adicionado de solução aquosa de etanol nas concentrações de 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, e então 15% (V/V) (Reagen-Quimibrás Indústrias Químicas S.A., Rio de Janeiro, Brasil), durante um período de cinco dias para cada concentração, mantendo-se a oferta de água e ração *ad libitum*. Nesse ponto, 10 camundongos foram aleatoriamente escolhidos para proceder em outra semana de adaptação a solução aquosa de sacarose acrescida de 40% de etanol. Ao atingir a concentração esperada de etanol (15% e 40%), a sacarose foi retirada, mantendo-se esta concentração de etanol para desenvolvimento dos padrões de dependência alcoólica. Então, os dois grupos obtidos, denominados EtOH15%/6 e EtOH40%/6, foram submetidos à exposição às soluções alcoólicas por mais seis meses, sendo continuamente monitorado o consumo médio de álcool em cada grupo. A concentração final para os grupos experimentais foi determinada procurando-se mimetizar a exposição humana a bebidas fermentadas e destiladas. Tendo em vista o interesse em investigar se o tempo de exposição é influente sobre possíveis alterações da mucosa bucal, outros dois grupos de

animais com dez indivíduos cada, foram mantidos por 12 meses nas mesmas condições descritas anteriormente, sendo então denominados EtOH15%/12 e EtOH40%/12. Em todo caso, as soluções eram preparadas e trocadas a cada dois dias. A quantidade diária de consumo de etanol foi acompanhada e os valores médios por grupo foram comparados estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney.

Para obtenção de dados basais, vinte camundongos foram também mantidos sempre apenas com água e ração *ad libitum*, a metade por seis meses, compondo o grupo C/6, e a outra metade deles por 12 meses, grupo C/12.



Figura 1 — Gaiola utilizada no período de adaptação, mostrando a garrafa contendo a solução alcoólica com solução açucarada (branca), bem como a ração e água (garrafa rosa) *ad libitum*.

Após o fim do período de exposição ao etanol, os animais foram sedados com éter, seguindo-se por coleta de sangue a partir de punção do plexo venoso retro-orbital, e então eutanásia por deslocamento cervical. Por dissecação, no intento de observar possíveis alterações macroscópicas orgânicas, foi então realizada a coleta dos órgãos descritos abaixo, juntamente com a orientação para coleta de amostras.

- a. **Língua e esôfago**, sendo que a língua foi seccionada longitudinalmente, lateralmente ao longo eixo; o menor segmento foi congelado em ultrafreezer, e o maior, junto com o esôfago foi fixado em formalina (formol a 10%).
- b. **Fígado**, sendo que um lobo de tamanho intermediário foi destacado e congelado, sendo os demais fixados em formol.
- c. **Estômago**, que foi seccionado longitudinalmente, sendo uma das metades congeladas e a outra fixada em formol.
- d. **Intestino delgado**, identificado como órgão de segmento tubular que se inicia imediatamente ao final da porção distal do estômago até o momento em que se observou

espessamento e coloração mais escurecida, fato traduzido como início do intestino grosso; o órgão foi então seccionado em três terços, o proximal, interpretado com o duodeno, foi seccionado na metade do seu comprimento e então a metade mais próxima ao estômago foi congelada e a outra fixada; o terço médio, interpretado como o jejuno, foi seccionado em quatro porções, sendo duas delas fixadas (2 e 4) e as demais (1 e 3) congeladas; o terço distal, interpretado como o íleo, foi seccionado em fragmentos pequenos, os menores dos obtidos par ao intestino delgado, e a metade (em número) desses fragmentos foi fixada e a outra congelada.

- e. **Intestino grosso**, identificado como descrito anteriormente e coletado até o reto, sendo apenas fixado.
- f. **Baço**, que foi apenas fixado.
- g. **Rins**, sendo um deles fixado e o outro congelado, sem distinção de lado.
- h. **Encéfalo**, sendo um dos hemisférios fixado e o outro congelado, sem distinção de lado.
- i. **Glândulas submandibulares**, identificadas como órgão lobulado subjacente à mandíbula, sendo uma delas fixada e a outra congelada, sem distinção de lado.

- j. **Fêmur**, apenas um deles, sem distinção de lado, sendo apenas fixado.

Os órgãos obtidos foram então fixados em formol a 10% por 24 horas e submetidos a exame macroscópico para inclusão em parafina na forma descrita a seguir:

- a. **Língua**, após o corte em sua base, separando-a do esôfago, foi seccionada três vezes transversalmente.
- b. **Esôfago**, seccionado em quatro cortes transversais.
- c. **Fígado**, que teve o maior lobo seccionado em três fragmentos, sendo os demais seccionados em dois cortes também transversais.
- d. **Estômago**, seccionado em três secções transversais.
- e. **Intestino delgado**, sendo cada segmento do órgão seccionado ao meio transversalmente no mínimo duas vezes.
- f. **Intestino grosso**, dividido inicialmente em três porções: anterior (mais fina), média (mais grossa) e terminal (correspondente ao reto, mais esbranquiçada). Cada um desses segmentos foi seccionado ao meio e assim sucessivamente até obter-se fragmentos menores que 1 cm.
- g. **Baço**, hemiesseccionado longitudinalmente.

- h. **Rim**, seccionado transversalmente em quatro segmentos.
- i. **Cérebro**, incluído sem cortes.
- j. **Fêmur**, desmineralizado e incluído sem secção prévia.

Obtenção e processamento de amostras biológicas

Após a remoção cirúrgica da língua dos animais mediante incisão submentoniana na linha média do assoalho bucal, tais amostras foram examinadas macroscopicamente para identificação de possíveis alterações evidentes e fixadas em solução de formol a 10% por um período de 24 horas. Estas peças foram então seccionadas no sentido perpendicular ao longo eixo da língua, em três partes com espessura craniocaudal similar, obtendo-se então amostras apicais, médias e posteriores do órgão. Seguiu-se por processamento histológico de rotina, com emblocamento em parafina histológica e microtomia para obtenção de secções teciduais com 3µm de espessura, dispensadas em lâminas previamente tratadas com silano (3-aminopropiltriétoxissilano), para ensaios posteriores.

Avaliação histopatológica

Para cada camundongo, uma lâmina foi corada em hematoxilina e eosina, pelo seguinte protocolo: os cortes foram inicialmente imersos em dois banhos consecutivos em xilol durante cinco minutos cada. Em seguida, as lâminas passaram por 10 lavagens em diversas cubas: duas contendo álcool absoluto, uma contendo álcool 95% e uma contendo álcool 80%. Posteriormente, passaram por uma lavagem em água para depois serem imersas em Hematoxilina de Harris por dois minutos, de onde seguiram para um recipiente contendo água em que permaneceram durante cinco minutos. Para coloração de fundo, as lâminas passaram por 10 lavagens em Eosina, e seguiram para 10 lavagens consecutivas em cubas contendo álcool 95%, álcool absoluto, álcool absoluto e álcool absoluto. Por fim, passaram por dois banhos em xilol, cada um por cinco minutos.

Inicialmente, as lâminas coradas foram avaliadas qualitativamente em busca de possíveis alterações displásicas no tecido epitelial, mediante uso de microscópio Nikon Eclipse E-400, em objetivas de 10×, 20× e 40× de magnificação.

Em seguida, realizou-se morfometria do epitélio para identificar possíveis alterações hipertróficas e hiperplásicas que

pudessem ser associadas ao consumo de álcool. Para esse intento, foi eleita a porção ventral e lateral, não papilar, da língua, tendo em vista que estas são regiões não protegidas por ceratina e, teoricamente, mais susceptíveis ao efeito da substância. Para cada amostra, toda essa extensão foi então fotografada (Motic, Moticom 2300, Motic Instruments, Inc., Canadá) no mesmo microscópio descrito anteriormente, em objetivas de 40× de magnificação. Com o auxílio de um *software* específico (Images Motic, Motic Images Plus 2.0ML, Motic Instruments, Inc., Canadá), em cada imagem foram traçadas cinco linhas equidistantes e perpendiculares à camada basal do epitélio. Tais linhas partiram do aspecto basal das células basais, idealmente seguindo o longo eixo dessas células, até o limite externo da camada de queratina. Para cada amostra, o comprimento médio de tais linhas em todos os campos histológicos fotografados foi então tomado como medida da espessura epitelial.

Imunoistoquímica

Para a evidênciação imunoistoquímica do antígeno metalotioneína, empregou-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase com a utilização do anticorpo monoclonal E9 (Dako, Carpinteria, EUA), considerando-se

a metodologia descrita a seguir (Cardoso et al., 2002).

Inicialmente, os cortes histológicos de 3µm de espessura foram desparafinados por três passagens em soluções de xilol, realizadas à temperatura ambiente por 18 horas, 15 e cinco minutos, respectivamente, seguindo-se por hidratação em soluções aquosas de concentrações descendentes de etanol (100%, 90% e 70%, cinco minutos cada banho) e então tiveram a atividade endógena de peroxidase bloqueada com solução de H₂O₂. Posteriormente, os cortes foram submetidos a tratamento com tampão EDTA, 1M, pH 8,2, em microondas, à potência máxima, em três ciclos de cinco minutos cada com dois minutos de descanso à temperatura ambiente entre cada ciclo, para recuperação do epítipo antigênico pesquisado.

Após resfriamento até equilíbrio térmico com o ambiente, os cortes foram lavados em água destilada e procedeu-se a incubação com o anticorpo primário, diluído (1:800) em tampão TRIS, pH 7,4, realizada em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 18 horas. Após lavagem em água destilada, os cortes foram incubados em anticorpo secundário biotilado na diluição de trabalho de 1:20, seguindo-se

por nova lavagem e incubação em solução de estreptavidina-biotina-peroxidase em diluição de 1:100, ambos em câmara úmida, por 30 minutos. Então, a revelação da reação foi desenvolvida a partir de solução cromógena a base de diaminobenzidina, incubada por três minutos, seguindo-se por lavagem em água corrente, por cinco minutos. Os cortes foram então contra-corados em hematoxilina de Harris, por 1 minuto, contrastada em água corrente, desidratados em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e três vezes a 100%), diafanizados em três banhos de xilol, e, finalmente, montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e goma de Damar.

A marcação nas camadas basal e parabasal do próprio epitélio de revestimento, além de eventuais células mioepiteliais de glândulas salivares menores presentes nas amostras, foi considerada como controle positivo interno. A omissão dos anticorpos primários foi empregada como controle negativo.

Para análise quantitativa da marcação da metalotioneína, procedeu-se a rotina similar à descrita para a avaliação das lâminas coradas em hematoxilina e eosina. Especificamente, além da espessura total do epitélio, foi também mensurada a

espessura do tecido apresentando marcação. Em ambas as avaliações (espessura total e espessura positiva), as retas originais foram sempre sobrepostas. Para cada par de retas, a proporção entre a espessura positiva e a espessura total foi considerada para determinar o índice de marcação. Finalmente, a média de todos os pares avaliados para cada amostra foi considerada como índice final para cada animal.

Análise estatística

Para identificar possíveis diferenças na média de espessura epitelial e do índice de marcação de metalotioneína entre os grupos avaliados, foi realizado teste de Kruskal-Wallis. Buscando identificar possível correlação entre a espessura epitelial e o índice de marcação de metalotioneína, foi executado teste de Spearman, considerando-se todas as amostras ou as amostras separadas por grupos. Probabilidade de hipótese nula verdadeira menor que 5% foi considerada estatisticamente significativa.

3. RESULTADOS

Durante o experimento, os animais do grupo EtOH40% consumiram, em média,

cerca de 60% mais solução alcoólica que os do grupo EtOH15%. Conseqüentemente, houve um consumo cerca de quatro vezes maior de etanol no primeiro em relação ao segundo grupo. Por outro lado, o consumo de água foi muito similar, no mesmo período (Tabela 1).

Tabela 1 – Consumo de água, solução alcoólica ou etanol, por animal, nos grupos experimentais.

Grupo	Consumo médio diário (mL)		
	Água	Solução alcoólica	Etanol*
EtOH15%	3,7	2,4	0,36
EtOH40%	3,8	3,9	1,56

* Calculado multiplicando-se a quantidade consumida da solução pela concentração.

Macroscopicamente, nenhuma alteração evidente (integridade, contorno, consistência, textura ou coloração) foi observada nas línguas dos animais avaliados. Da mesma forma, não foram encontradas alterações microscópicas compatíveis com displasia epitelial ou qualquer outra lesão caracterizável morfológicamente para esse tecido. Ainda, o epitélio mostrou estrutura usual, com boa

definição das camadas basal, parabasal, espinhosa, pavimentosa e ceratinizada, em todos os animais, de todos os grupos. Quantitativamente, observou-se que a espessura epitelial total foi muito similar entre os grupos avaliados ($60,8 \pm 6,3\mu\text{m}$ para grupo controle; $59,1 \pm 9,6\mu\text{m}$ para grupo EtOH15%; e $56,8 \pm 9,8\mu\text{m}$ para grupo EtOH40%), não sendo identificada diferença estatisticamente significativa entre os mesmos ($p = 0,48$, teste de Kruskal-Wallis), como apresentado na Figura 1.

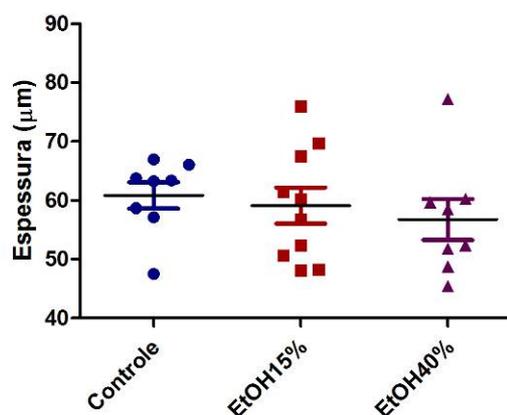


Figura 1 – Distribuição dos animais avaliados, segundo grupo e espessura epitelial (em μm) da região dorsoventral da língua (barras centrais = média; suíças = desvio-padrão).

A marcação imunoistoquímica da metalotioneína, de forma geral para os três grupos avaliados, foi evidenciada por

coloração acastanhada, homogênea ou por vezes formando grumos mais grosseiros. Esta marcação teve intensidade variável e foi localizada basicamente nas camadas basal e parabasal, nuclear e, ou, citoplasmática, como mostrado nas Figuras 2 a 4.

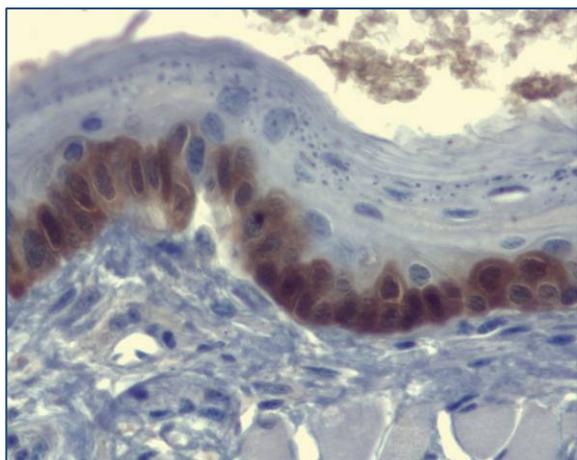


Figura 2 – Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6 do grupo controle, mostrando marcação da metalotioneína. Observa-se coloração de intensidade moderada a forte, localizada com maior frequência no citoplasma, mas também no núcleo, basicamente nas camadas basal e parabasal (estreptavidina-biotina-peroxidase; magnificação original: 1600x).

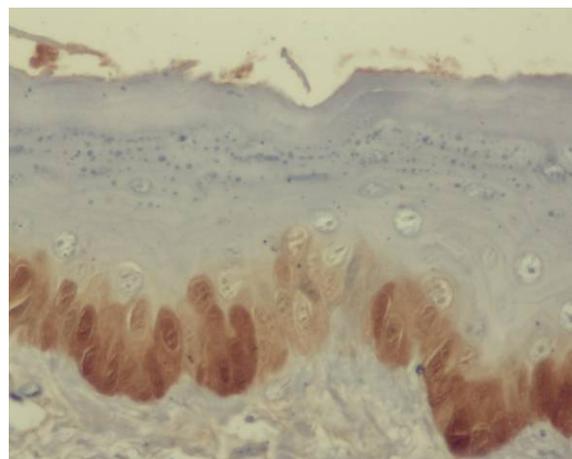


Figura 3 - Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6 do grupo EtOH15%, mostrando marcação da metalotioneína. Observa-se coloração de intensidade fraca a forte, localizada com maior frequência no citoplasma e no núcleo, basicamente nas camadas basal e parabasal (estreptavidina-biotina-peroxidase; magnificação original: 1600x).

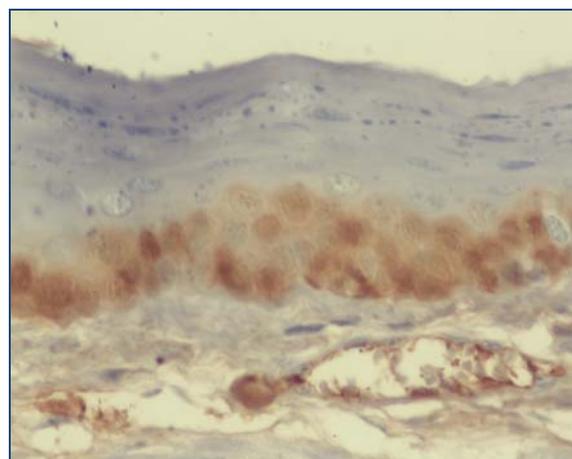


Figura 4 - Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6 do grupo EtOH40%, mostrando marcação da metalotioneína. Observa-se coloração de intensidade fraca a moderada, localizada com

maior frequência no citoplasma, mas também no núcleo, basicamente nas camadas basal e parabasal (estreptavidina-biotina-peroxidase; magnificação original: 1600x).

De forma similar ao observado na análise da espessura epitelial, quantitativamente, observou-se que o índice de marcação imunohistoquímica da metalotioneína foi muito semelhante entre os grupos avaliados ($0,37 \pm 0,08$ para grupo controle; $0,36 \pm 0,02$ para grupo EtOH15%; e $0,38 \pm 0,07$ para grupo EtOH40%), não sendo identificada diferença estatisticamente significativa entre os mesmos ($p = 0,56$, teste de Kruskal-Wallis), como apresentado na Figura 5.

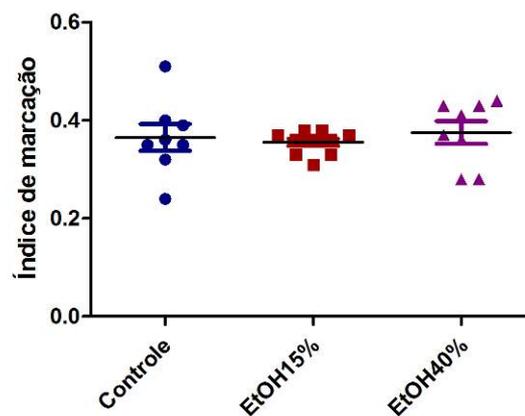


Figura 5 – Distribuição dos animais avaliados, segundo grupo e índice de marcação imunohistoquímica da metalotioneína na região dorsoventral da língua (barras centrais = média; suíças = desvio-padrão).

Finalmente, não houve qualquer correlação significativa entre a espessura epitelial e o índice de marcação da metalotioneína, tanto quando avaliados todos os animais em um único conjunto, quanto quando avaliados por grupos, como mostrado na Figura 6.

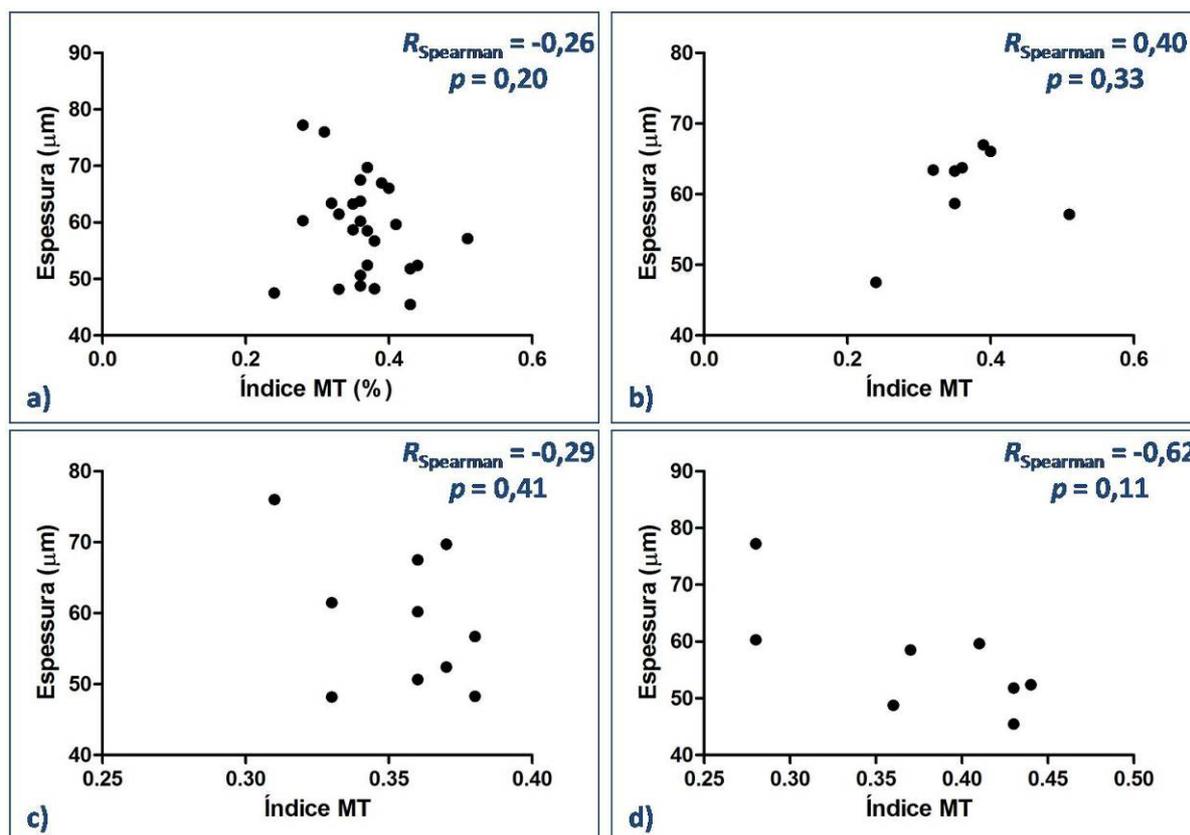


Figura 6 – Análise de correlação entre a espessura (avaliada em hematoxilina e eosina) e o índice de marcação imunohistoquímica do antígeno metalotioneína no epitélio lingual ventrolateral: a) de todos os animais avaliados; b) dos animais do grupo controle; c) dos animais do grupo EtHO15%; d) dos animais do grupo EtOH40%.

4. DISCUSSÃO

O estudo experimental dos efeitos do álcool sobre a mucosa bucal, bem como de outros órgãos, é relevante pela escassez de trabalhos sobre o assunto. O presente artigo relata um modelo experimental de alcoolização crônica, delineado em função da necessidade de obtenção de material biológico para investigações histopatológicas e moleculares, necessárias para melhor compreensão da associação

entre alcoolismo e câncer bucal. Nesse sentido, é importante enfatizar que não eram esperadas alterações macroscópicas evidentes na mucosa da língua dos animais estudados, tais como a formação de tumores ou de lesões cancerizáveis (como leucoplasia), tendo em vista que estudos anteriores não evidenciaram lesões (Born et al., 1996; Maier et al., 1994; al-Damouk, 1993). A única observação de formação de tumores na mucosa da boca foi relatada em um modelo de alcoolização que durava toda a vida de ratos (Soffritti et al., 2002),

parâmetro esse que não consideramos consistente com o que se observa em humanos. Não obstante, pode contribuir para futuras melhorias do modelo aqui proposto. Além disso, dada a riqueza do material coletado, proveniente de vários órgãos, será possível investigar alterações em outros sítios, possibilitando o cruzamento de resultados com aqueles identificados na mucosa bucal, favorecendo a identificação de possíveis interações sistêmicas com o surgimento do câncer bucal.

Em um estudo experimental de alcoolização, torna-se possível evitar outros possíveis fatores reconhecidamente intervenientes sobre a carcinogênese bucal, tais como idade, tempo de exposição, desnutrição e, principalmente, concomitância de tabagismo, além do possível controle sobre concentração e quantidade consumida de álcool, bem como do período de exposição (Tabakoff e Hoffman, 2000).

Quanto aos modelos já descritos na literatura que tenham avaliado o efeito do etanol sobre a mucosa da boca de animais experimentais, é relevante o comentário de que diversas espécies têm sido empregadas, tais como hamsters sírios, ratos Sprague-Dawley ou Wistar, camundongos CF1 (Maito et al., 2003;

Soffritti et al., 2002; Maier et al., 1994; al-Damouk, 1993). A cepa C57/BL6 de camundongos tem sido descrita como particularmente susceptível ao consumo crônico de álcool, em maiores quantidades (Yoneyama et al., 2008). As condições de manutenção dos animais seguiram parâmetros que são considerados adequados para essa espécie (Chorilli et al., 2007).

A definição da concentração de etanol nas soluções utilizadas teve por base o que ocorre com humanos, considerando-se que a concentração de 15% mimetizaria bebidas fermentadas com alto teor alcoólico, e a de 40% assimilaria bebidas destiladas. Além disso, cita-se que essa última constituiria o limite máximo de consumo voluntário para roedores, tendo em vista não provocar efeitos nocivos agudos (Spanagel, 2003). Foi interessante observar que os animais expostos a uma dieta com maior concentração de etanol também consumiram quantidades significativamente maiores de bebida. Tal fator pode estar associado a maior desidratação, tendo em vista que o álcool acelera o processo de diurese, embora exista relato de que o uso crônico de bebidas alcoólicas possa ter um efeito antidiurético, ao menos em ratos (Parlesak et al., 2004).

Por outro lado, os períodos de consumo utilizados procuraram corresponder a aproximadamente 20 e 40 anos de exposição contínua na espécie humana, ou um terço a dois terços da expectativa de vida dos animais, ainda que tal comparação careça de maior rigor científico (Chorilli et al., 2007). Por outro lado, a maior parte dos estudos sobre efeitos do etanol em animais experimentais descreve efeitos agudos, e outros que se dedicam a efeitos crônicos apresentam períodos de exposição variados, dificultando comparações mais precisas entre os resultados descritos (Maito et al., 2003, Spanagel, 2000, Izzotti et al., 1998).

O consumo crônico de álcool é considerado um importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer no trato aerodigestivo, sendo inclusive já evidenciada, por vários estudos epidemiológicos, a associação entre o consumo de álcool e a ocorrência de cânceres nos diversos órgãos aí localizados. O acetaldeído, primeiro metabólito do etanol, por sua toxicidade e efeitos mutagênicos, tem sido sugerido como o principal responsável pela relação observada entre o alcoolismo e a carcinogênese. Ainda, já foi demonstrado que, agindo como solvente ao danificar o sistema de membranas celulares, o álcool aumenta a permeabilidade da mucosa aos

agentes carcinogênicos, especialmente os produtos do tabaco.

Entretanto, estudos experimentais que se utilizam de alcoolização crônica de roedores, mostraram que o álcool não atua isoladamente como um fator carcinogênico, mas como um colaborador no processo de carcinogênese, visto que os animais submetidos ao consumo crônico de etanol não desenvolveram mais neoplasias malignas do que os animais controle. Assim, o álcool funcionaria como um co-carcinógeno (Ketcham et al., 1963).

A observação de não haver diferença na expressão imunoistoquímica de metalotioneína foi um achado surpreendente, pois outros trabalhos já haviam demonstrado diferenças na expressão dessa molécula em tecidos submetidos ao álcool (Zhou et al., 2008). Esse resultado mostra que outras vias e moléculas devem ser avaliadas, buscando-se melhorar o entendimento sobre os mecanismos pelos quais o etanol favorece o surgimento de tumores, em especial das moléculas associadas ao reparo de DNA.

Em conclusão, o presente modelo oferece a oportunidade de avaliar os efeitos biológicos do consumo crônico de álcool sobre a mucosa bucal e outros órgãos, controlando fatores que são considerados importantes na carcinogênese humana, em

particular da concentração e do tempo de exposição, e pode ser utilizado em estudos futuros que possam contribuir para a melhoria do conhecimento sobre o assunto. Todavia, outros fatores, tais como a avaliação do peso dos animais, período estendido de consumo, disponibilização ou não de garrafas separadas para solução etanólica e água, e incorporação de acetaldeído são mencionados como parâmetros adicionais que podem ser agregados ao modelo conforme a disponibilidade e interesse específico da pesquisa. Finalmente, o modelo proposto precisa ser avaliado e, se possível, validado para ampliação de seu uso com finalidade científica, motivo pelo qual acreditamos ser oportuna sua publicação em veículo de divulgação.

5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho recebeu apoio financeiro do CNPq (processo D-034/2008).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-DAMOUK, J.D. Oral epithelial response to experimental chronic alcohol ingestion in hamsters. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 76(6), p.736-741, 1993.

BAUMBERG, B.; ANDERSON, P. Health, alcohol and EU law: understanding the impact of European single market law on alcohol policies. *European Journal of Public Health*, v. 18, nº4, p.392–398, 2008.

BOFFETTA, P.; HASHIBE, M. Alcohol and cancer. *The Lancet Oncology*, v. 7, p. 149–156, 2006.

BORN, I.A.; ZÖLLER, J.; WEIDAUER, H.; MAIER, H. Effects of chronic alcohol drinking on mouth mucosa. A morphometric study. *Laryngorhinootologie*, v. 75, n. 12, p. 754 – 758, 1996.

CAHILL, A. Effects of alcohol and oxidative stress on liver pathology: the role of the mitochondrion. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. Jun26(6), p. 907-915, 2002.

CARDOSO, S.V.; BARBOSA, H.M.; CANDELLORI, I.M.; LOYOLA, A.M.; AGUIAR, M.C. Prognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv*, v. 441, n. 2, p. 174-78, 2002.

CHERIAN, MG.; JAYASURYA A.; BAY, BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutation Research*, v. Dec 10;533(1-2):201-9, 2003.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n.1, p.11-23, 2007.

CUNNINGHAM, C.L. et al. Animal Models of Alcohol's Motivational Effects. *Alcohol Research & Health*, v. 24, n° 2, 2000.

DOLL, R.; FORMAN, D.; LA VECCHIA, C. Alcoholic beverages and cancers of the digestive tract and larynx. *Health Issues Related to Alcohol Consumption*, 2nd ed, p. 351-393, 1999.

DUMITRESCU, R.G; SHIELDS, P.G. The etiology of alcohol-induced breast cancer. *Alcohol*, v. 35, p. 213–225, 2005.

GILLISON, M. L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head & Neck*, v. Aug29(8), p. 779-792, 2007.

GO, V.L.; BUTRUM, R.R.; NORMAN, H.A. Review of the international research conference on food, nutrition and cancer. *The Journal of nutrition*, v. 135, n.12, p. 2925S – 2926S, 2005.

HAQ, F.; MAHONEY, M.; KOROPATNICK, J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research*, v. Dec 10; 533(1-2):211-26, 2003.

HASHIBE, M. et al. Alcohol Drinking in Never Users of Tobacco, Cigarette Smoking in Never Drinkers, and the Risk of Head and Neck Cancer: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, p. 777 – 789, 2007.

HOWIE, N.M. et al. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Diseases*, v. 7, p. 349-354, 2001.

IDE, R. et al. Cigarette smoking, alcohol drinking, and oral and pharyngeal cancer mortality in Japan. *Oral Diseases*, v. 14, n. 4, p. 314-19, 2008.

IZZOTTI, A. et al. DNA alterations in rat organs after chronic exposure to cigarette smoke and/or ethanol ingestion. *The FASEB Journal*, v.12, 1998.

KETCHAM, A.S.; WEXLER, H.; MANTEL, N. Effects of alcohol in mouse neoplasia. *Cancer research*, v. 23, p. 667-70, 1963.

KLATSKY, A.L. Alcohol Drinking and Risk of Hospitalization for Heart Failure With and Without Associated Coronary Artery Disease. *The American Journal of Cardiology*, 2007.

LEYSHON-SØRLAND, K.; STANG, E. The ultrastructural localization of metallothionein in cadmium exposed rat liver. *Histochem. J.*, v. 25, n. 12, p. 857-864, 1993.

MAIER, H. et al. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v. 18, n. 2, p. 387-91, 1994.

MAITO, F.L. et al. Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of, or topical exposure to,

alcohol. *Alcohol*, v. 31(1-2), p. 25-30, 2003.

MCKILLOP, I.H.; SCHRUM, L.W. Alcohol and liver cancer. *Alcohol*, v. 35, p.195–203, 2005.

PARLESAK, A. et al. Water metabolism in rats subjected to chronic alcohol administration. *Nephron Physiology*, v. 97(1), p. 9-15, 2004.

PÖSCHL, G.; SEITZ, K.H. Alcohol and Cancer. *Alcohol & Alcoholism*, v. 39, n. 3, p. 155–165, 2004.

SPANAGEL, R. Recent Animal Models of Alcoholism. *Alcohol Research & Health*, 2000.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; CEVOLANI, D.; GUARINO, M.; PADOVANI, M.; MALTONI, C. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of methyl alcohol and ethyl alcohol in rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 982, p. 46-69, 2002.

TABAKOFF, B; HOFFMAN, P.L. Animal Models in Alcohol Research. *Alcohol research & health*, v. 24, n. 2, p. 77 – 84, 2000.

VISAPAA, J.P. et al. Increased cancer risk in heavy drinkers with the alcohol dehydrogenase 1C*1 allele, possibly due to salivary acetaldehyde. *Gut*. v. Jun;53(6):871-6, 2004.

YONEYAMA, N.; CRABBE, J.C.; FORD, M.M.; MURILLO, A.; FINN, D.A.

Voluntary Ethanol Consumption in 22 Inbred Mouse Strains. *Alcohol*, v. 42(3), p. 149-160, 2008.

ZHOU, Z.; LIU, J.; SONG, Z.; MCCLAIN, C.J.; KANG, Y.J. Zinc supplementation inhibits hepatic apoptosis in mice subjected to a long-term ethanol exposure. *Experimental biology and medicine*, v. May; 233(5):540-8, 2008.

CHRONIC EXPOSURE TO ETHANOL: CITOTOXIC EFFECT OVER MICE LINGUAL EPITHELIUM, EVALUATED BY METALLOTIONEIN EXPRESSION

TALITA FRANCO⁸

DANILO SALETI FRANÇA⁹

BIANCA CAROLINE SILVA¹⁰

MARCUS VINÍCIOS CAIXETA¹¹

PAULO ROGÉRIO DE FARIA¹²

ADRIANO MOTA LOYOLA¹³

SÉRGIO VITORINO CARDOSO¹⁴

Abstract: *Alcoholic beverages are associated to direct carcinogenic effects over oral epithelium, potentially behaving like mutagenic agents starting from the more intense generation of free radicals. In order to get further information about alcohol participation on oral carcinogenesis, as well as the effects of that substance on other organs, we propose an experimental model to evaluate the alterations caused by alcohol chronic consumption over oral mucosal. C57BL/6 mice were used; strain characterized by great chance of ethanol consumption and, after acclimation period, was submitted to exposure to alcoholic solutions on concentrations of 15% and 40%, during 6 or 12 months, trying to mimic the variance of concentration and period of exposure considered important to human species. There was a greater consumption of etanol in the groups displayed to a diet with higher alcoholic concentration. The marking of the expression of metallothionein, enters the groups displayed to the solutions of etanol, did not disclose significant differences. The same happened when compared these groups displayed to etanol consumption with control group, also not showing significant quantitative differences between all the studied groups. The apparent inexistence of differences between the evaluated groups suggests that the carcinogenic effect of etanol on the oral mucosa can not be related directly to oxidative stress. On the other hand, other consequences of the chronic consumption of etanol gain force, such as malnutrition and the increase of permeability of the cellular membranes, which can play more significant role than the formation of free radicals.*

⁸ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia. Av. Pará, 1720, CEP 38400-902, Uberlândia, MG. talitafrc@yahoo.com.br

⁹ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia. dansafranca@terra.com.br

¹⁰ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia. biancacs01@yahoo.com.br

¹¹ Curso de Biomedicina, Universidade Presidente Antônio Carlos. marcaocaixeta@hotmail.com

¹² Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia. fariapr@yahoo.com.br

¹³ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia. adrianol@hc.ufu.br

¹⁴ Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Uberlândia. cardososv@gmail.com

Key-words: Alcohol, cancer, oral mucosal, experimental model, carcinogenesis.