

DANILO SALETTI FRANÇA

**Carcinogênese bucal – Efeito da
exposição crônica a soluções de etanol
sobre o epitélio lingual de camundongos.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Uberlândia - MG

2009

DANILO SALETTI FRANÇA

**Carcinogênese bucal – Efeito da
exposição crônica a soluções de etanol
sobre o epitélio lingual de camundongos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: **Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Uberlândia - MG

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**RELATÓRIO DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE MESTRADO DO
CD DANILO SALETTI FRANÇA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.**

Às nove horas do dia vinte e oito de agosto do ano de dois mil e nove, reuniu-se a Comissão Julgadora indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia/UFU, para o julgamento da Dissertação de Mestrado apresentada pelo candidato DANILO SALETTI FRANÇA com o título: *Carcinogênese bucal: efeitos da exposição crônica a soluções de etanol sobre o epitélio lingual de camundongos*. O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de argúição pelos examinadores. Encerrada a argúição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo encontra-se em condições de ser incorporado ao banco de Dissertações e Teses da Biblioteca desta Universidade. Acompanham este relatório os pareceres individuais dos membros da Comissão Julgadora.

Uberlândia 28 de agosto 2009

Sádolo
Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso
Titulação: Doutor
Universidade Federal de Uberlândia

Aprovado
Aprovado/Reprovado

Karen
Profa. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki
Titulação: Doutora
Universidade Federal de Uberlândia

Aprovado
Aprovado/Reprovado

Rosy
Profa. Dra. Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro
Titulação: Doutora
Universidade Federal de São João Del Rei

Aprovado
Aprovado/Reprovado

Aos meus pais Estevão e Léia, pelo incentivo, carinho, amor e, sobretudo, a confiança que a mim foi dada em mais essa conquista. Sou muito grato a vocês hoje e sempre. Saibam que essa vitória é nossa.

Aos meus irmãos Gustavo e Renata, sempre presentes em minha vida, me ajudando nas horas difíceis e compartilhando as horas boas. Obrigado por existirem em minha vida.

Dedico este trabalho a vocês.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor Doutor Sérgio Vitorino Cardoso pelos ensinamentos de vida e, dentro destes, os profissionais durante todo o nosso convívio. Obrigado por acreditar em mim, me dando essa oportunidade única em realizar mais esse sonho em minha vida. Sei que sem a sua ajuda, nada disso seria possível. Espero um dia poder retribuir tudo isso que fez por mim. A você, os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao meu co-orientador Professor Doutor Adriano Mota Loyola pelo apoio, amizade, confiança a, acima de tudo, pelos conhecimentos passados, tanto profissionais como pessoais. Tudo isso foi muito bem recebido por mim e farão parte de minha vida sempre.

Ao Professor Doutor Paulo Rogério de Faria pela ajuda durante todo o mestrado, compartilhando conhecimentos e orientação em minha pesquisa. Além disso, pela amizade e confiança que a mim foi dada.

A todos os servidores da patologia que contribuíram durante toda a minha estada com vocês, cedendo seus espaços e me apoiando ao longo dessa jornada, em especial, à Déborah Fagundes, pela ajuda, incentivo e amizade durante todos esses meses.

Aos meu amigos Talita, Marcus Vinícius, Bianca e Roberto Bernardino por todo o apoio, e ajuda durante todo o tempo. Agradeço muito a atenção e a amizade de vocês, sem isso, não chegaria e essa conquista.

A toda a equipe de professores do mestrado que fizeram parte de minha formação profissional durante esta etapa de minha vida. Agradeço pelos ensinamentos e experiências compartilhadas ao longo desses anos. Saibam que na minha vida profissional, levarei um pouquinho de conhecimento de cada um de vocês.

A Abigail pela atenção e carinho que me foi dada durante todo esse tempo. Saiba que isso jamais será esquecido.

A toda a equipe da HD Ensinos Odontológicos pela amizade e companheirismo todo esse tempo, me ajudando e me incentivando sempre. Em especial, meus mais sinceros

agradecimentos ao Denildo e ao Helder, pela amizade e pela confiança, principalmente em minha vida profissional, que depositaram em mim. Isso jamais será esquecido.

Aos meus colegas de mestrado, compartilhando conhecimentos, nos incentivando uns aos outros e nos dando forças para a conclusão de mais essa etapa em nossas vidas.

Ao meu amigo e professor Aderval do Nascimento pela amizade e, principalmente pelo incentivo em realizar mais essa conquista em minha vida. Sem sua ajuda, nunca conseguiria chegar onde estou.

A toda a minha família pelo companheirismo e incentivo durante todo esse tempo, em especial, a minha avó Ruth pelo carinho, estando sempre presente em todas as etapas da minha vida.

Aos meus amigos e colegas que participaram, direta ou indiretamente, dessa fase tão importante em minha vida, nos divertindo nas horas boas e nos ajudando nas horas difíceis. Sem a amizade de vocês, tudo seria mais difícil.

APOIO FINANCEIRO

Este projeto contou com o apoio financeiro das agências governamentais de suporte à pesquisa científica CNPq e CAPES.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE GRÁFICOS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	13
RESUMO	14
1) INTRODUÇÃO	15
2) REVISÃO DA LITERATURA	17
a) Anatomia oral e da língua	17
b) Câncer oral	18
i) Carcinoma epidermóide oral	18
(1) Epidemiologia	18
(i) Epidemiologia global	18
(ii) Epidemiologia no Brasil	20
(2) Fatores de risco	21
(a) Álcool	22
c) Metalotioneína	24
i) Metalotioneína, álcool e câncer	27
3) OBJETIVOS	29
a) Objetivo geral	29
b) Objetivos específicos	29
4) MATERIAL E MÉTODOS	30
a) Experimento de alcoolização	30
i) Animais	30
ii) Condições de manutenção experimental e adaptação	30
iii) Consumo e adaptação ao álcool	31

iv) Exposição experimental ao etanol	31
v) Obtenção e processamento inicial das amostras teciduais	32
b) Avaliação histopatológica	33
c) Avaliação imunoistoquímica da expressão de metalotioneína	34
<i>i) Protocolo laboratorial</i>	34
<i>ii) Análise</i>	35
5) RESULTADOS	38
a) Análise qualitativa dos achados macroscópicos e microscópicos dos epitélios linguais corados em hematoxilina e eosina	38
b) Avaliação morfométrica do epitélio	39
c) Expressão imunoistoquímica da metalotioneína	40
d) Avaliação morfológica da expressão da metalotioneína	42
e) Avaliação morfométrica do epitélio em relação à avaliação morfológica da expressão da metalotioneína	42
6) DISCUSSÃO	44
7) CONCLUSÕES	51
8) REFERÊNCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 - Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6, corada por hematoxilina e eosina. Observa-se na figura a representação gráfica do procedimento empregado para a mensuração do epitélio (magnificação original: 1600x). Observa-se que em cada campo de imagem, 5 retas foram traçadas, ressaltando que, para cada animal, 10 campos de imagem foram mensurados. **37**

Figura 2 - Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6, mostrando marcação imunoistoquímica de metalotioneína. Observa-se na figura a representação gráfica do procedimento empregado para a mensuração da marcação positiva da MT (estreptavidina-biotina-peroxidase; magnificação original: 1600x). A) O comprimento total do epitélio; B) Área marcada positivamente para a MT. Dividindo-se o valor de “B” pelo valor de “A” será obtida a porcentagem marcada positivamente para a MT. **37**

Figura 3 – Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6 do grupo controle, mostrando marcação imunoistoquímica de metalotioneína. Observa-se coloração de intensidade moderada a forte, localizada com maior freqüência no citoplasma mas também no núcleo, basicamente nas camadas basal e parabasal (estreptavidina-biotina-peroxidase; magnificação original: 500×). **40**

Figura 4 - Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6 do grupo EtOH15%, mostrando marcação imunoistoquímica de metalotioneína. Observa-se coloração de intensidade fraca a forte, localizada com maior freqüência no citoplasma e no núcleo, basicamente nas camadas basal e parabasal (estreptavidina-biotina-peroxidase; magnificação original: 500×). **• 41**

Figura 5 - Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6 do grupo EtOH40%, mostrando marcação imunoistoquímica de metalotioneína. Observa-se coloração de intensidade fraca a moderada, localizada com maior freqüência no citoplasma mas também no núcleo, basicamente nas camadas basal e parabasal (estreptavidina-biotina-peroxidase; magnificação original: 500×). **41**

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Média do consumo de água, solução alcoólica ou etanol, por animal, nos grupos experimentais.	• 38

LISTA DE GRÁFICOS

Página

Gráfico 1 – Diagrama de barras e suíças representando os resultados das mensurações de espessura total do epitélio lingual. Distribuição dos animais avaliados, segundo grupo e espessura epitelial (em μm) da região ventro-lateral da língua (barras centrais = média; suíças = desvio-padrão). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos avaliados, com $p=0,48$ (teste de Kruskal-Wallis). **39**

Gráfico 2 – Diagrama de barras e suíças representando os resultados dos índices de marcação imunoistoquímica do antígeno para MT no epitélio lingual. Distribuição dos animais avaliados, segundo grupo e índice de marcação imunoistoquímica da metalotioneína na região ventro-lateral da língua (barras centrais = média; suíças = desvio-padrão). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos avaliados, com $p=0,56$ (teste de Kruskal-Wallis). **42**

Gráfico 3 – Análise de correlação entre a espessura (avaliada em hematoxilina e eosina) e o índice de marcação imunoistoquímica do antígeno metalotioneína no epitélio lingual ventro-lateral: a) de todos os animais dos três grupos avaliados; b) dos animais do grupo controle; c) dos animais do grupo EtHO15%; d) dos animais do grupo EtOH40%. **43**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μm – Micrômetro (unidade de medida)

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

UNICAMP – Universidade de Campinas

MT - Metalotioneína

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

EDTA – Do inglês “Ethylene Diamine Tetraacetic Acid” – ácido etilenodiamino tetracético

HE – Hematoxilina e eosina

EtOH15% - Grupo submetido ao consumo de etanol na concentração de 15%

EtOH40% - Grupo submetido ao consumo de etanol na concentração de 40%

INCA – Instituto Nacional do Câncer

MS – Ministério da Saúde

Kda – Unidade de massa atômica - peso molecular

LEA – Laboratório de Experimentação Animal

® - Representação de “marca registrada”

et al. – Expressão do latim – “e outros colaboradores”

E9 – Nome dado ao anticorpo monoclonal empregado para detecção do antígeno MT

TRIS – Abreviação do composto orgânico conhecido como tris(hidroximetil) aminometano

p - Probabilidade

RESUMO

O câncer oral tem se tornado um problema que atinge várias partes do mudo e está relacionado com vários fatores coadjuvantes. Além disso, pode influenciar diretamente no acometimento dos tumores malignos. Dentre estes fatores, destacam-se o uso do tabaco e o consumo do álcool. O álcool causa agressão à mucosa pelo contato físico, levando a alterações em suas camadas, como a alteração na sua espessura, inclusive no epitélio. Também causa o aumento da permeabilidade epitelial, favorecendo assim a entrada de substâncias carcinógenas. Estudos experimentais em camundongos *knockout* para o gene da metalotioneína têm mostrado seu papel protetor em quadros de intoxicação alcoólica aguda. Desta forma, a quantidade de metalotioneína nos tecidos em que é encontrada, está diretamente relacionada com o prognóstico para o câncer. O objetivo deste estudo foi avaliar quantitativamente alterações estruturais e a expressão imunohistoquímica de metalotioneína no epitélio lingual de camundongos submetidos à ingestão crônica de álcool. Para isso, foi utilizado um ensaio de três grupos com dez animais cada, a saber: grupo controle (sem etanol), grupo EtOH15% (etanol a 15%) e grupo EtOH40% (etanol a 40%). Os animais foram monitorados durante todo o período experimental, que foi de seis meses. As alterações epiteliais foram avaliadas pela mensuração na sua espessura, onde foi obtida a espessura total deste epitélio. A expressão da metalotioneína foi verificada pela técnica da streptavidina-biotina-peroxidase com anticorpo primário anti-MT (E-9), cujos resultados foram expressos como índice de marcação, obtendo-se o percentual marcado para os três grupos. Os resultados em relação à espessura epitelial mostraram que não houve diferenças significantes entre os três grupos avaliados. A expressão da metalotioneína também não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados. Finalmente, não foi observada correlação significativa entre a expressão de metalotioneína e a espessura epitelial e entre estes e os parâmetros histológicos e imunohistoquímicos. Desta forma, concluiu-se que a alcoolização crônica não favorece o aumento da camada epitelial, nas concentrações estudadas, não favorecendo também alterações na expressão de metalotioneína no epitélio lingual de camundongos.

1) INTRODUÇÃO

O câncer oral é um sério problema em várias partes do globo, tanto por sua relativa alta incidência, quanto pela morbidade e mortalidade significativas associadas a essa doença. É importante ainda mencionar que são várias as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral. Porém, a supremacia epidemiológica do carcinoma epidermóide sobre as outras neoplasias malignas o torna praticamente sinônimo de câncer oral. Dados epidemiológicos mostram, de forma muito clara, que os principais fatores associados ao risco de desenvolvimento do carcinoma epidermóide oral são o tabagismo e o etilismo, sendo importantes o tempo de uso e as quantidades ingeridas, podendo tais fatores atuar isoladamente ou em conjunto, com efeito potencializador.

Especificamente sobre o álcool, existem ainda dúvidas sobre a natureza biológica de sua influência na carcinogênese oral. Bebidas alcoólicas podem simplesmente agir como solventes, dessa maneira, facilitando a passagem dos carcinógenos pela membrana celular. Alternativamente, o consumo de etanol aumenta a atividade metabólica no fígado, incrementando em consequência a ativação de carcinógenos indiretos. Em especial, um dos principais metabólitos do álcool, o acetaldeído, formado principalmente no fígado, mas também na própria cavidade oral, parece ser importante na transformação neoplásica da mucosa oral. Radicais livres produzidos a partir do etanol também poderiam atuar como adutos, induzindo mutações eventualmente carcinogênicas. Outra possibilidade diz respeito à deficiência nutricional que usualmente acompanha o alcoolismo. Finalmente, a concentração do etanol alcançada nos humanos pode causar irritação local, ativando a proliferação celular e, portanto, atuando como agente promotor da carcinogênese.

A metalotioneína é uma proteína cuja superexpressão está relacionada ao pior prognóstico em diversos tipos de câncer, incluindo o carcinoma epidermóide oral. A composição molecular e a conformação estrutural dessa molécula a tornam capaz de se ligar a até doze átomos metálicos, particularmente ao zinco em contexto fisiológico, ou a outros compostos eletricamente carregados, tais como radicais livres. Nesse sentido, quando exposta a ambiente oxidante, a metalotioneína libera seus átomos metálicos e capta radicais livres, efeito potencializado por ação similar promovida pelo zinco. Tais propriedades sugeriram participação da metalotioneína na homeostasia celular e na neutralização de compostos genotóxicos, exibindo, dessa forma, notável capacidade citoprotetora.

Existem fortes evidências que o estresse oxidativo e o acetaldeído produzidos a partir do etanol têm um papel importante na etiologia e no desenvolvimento do câncer oral, e, dadas as aparentes funções biológicas da metalotioneína, foi proposto no presente estudo avaliar a magnitude das alterações morfológicas e na expressão da metalotioneína no epitélio da mucosa lingual de camundongos cronicamente expostos a soluções alcoólicas, de diferentes concentrações.

2) REVISÃO DE LITERATURA

a) Anatomia oral e da língua

A cavidade oral se estende desde os lábios até as dobras do palatoglosso, sendo delimitada na extremidade vestibular pelos lábios e bochechas, formando um espaço semelhante a uma fenda, separando estes da gengiva e dos dentes. Está limitada acima e abaixo pelo fórnice mucoso dos lábios e bochechas. O espaço delimitado pelos dentes e gengivas é a cavidade oral propriamente dita. É delimitada inferiormente pelo assoalho da boca e língua e superiormente pelo palato duro (Slootweg e Eveson, 2005).

A parte oral da língua (seus dois terços anteriores) se inicia em frente ao sulco terminal em forma de “V”. É móvel e aderida ao assoalho da boca anteriormente pelo freio lingual mediano. A parte dorsal é coberta por epitélio estratificado pavimentoso e contém vários tipos de papilas. A maioria dessas são filiformes, e apresentam intensa queratinização. Existem também, em menor número e uniformemente separadas, papilas fungiformes, nódulos de cor rosa que contêm botões gustativos. Ainda, em frente ao sulco terminal existem de 10 a 12 papilas circunvaladas, que contém algumas papilas gustativas na superfície e estão dentro de um sulco profundo que envolve cada papila, com ductos de glândulas salivares menores que se abrem dentro da base desse sulco. No aspecto lateral da língua, onde encontram a dobra palatoglossal, existem papilas em forma de folha. Essas também podem conter botões gustativos na superfície, com o centro da papila mostrando com frequência agregados linfóides similares àqueles encontrados no anel de Waldeyer. Existem também glândulas salivares menores na musculatura lingual latente. O ventre da língua é coberto por um fino epitélio estratificado, pavimentoso e não queratinizado, o qual é contínuo com mucosa de revestimento semelhante no assoalho da boca. Glândulas salivares menores (glândulas de Blandin e Nuhn) estão presentes, predominantemente em direção à linha média e profundamente situadas dentro da musculatura lingual, podendo eventualmente se estender até o ápice da língua (Slootweg e Eveson, 2005).

b) Câncer oral

De acordo com as perspectivas epidemiológicas e clinicopatológicas, o câncer oral pode ser dividido em três categorias: carcinomas de cavidade oral propriamente ditas, carcinomas do vermelhão do lábio, e tumores de glândulas salivares. O câncer de lábio está associado com a exposição aos raios ultravioletas, enquanto que tumores das glândulas salivares não são diretamente relacionados com uso de tabaco ou o consumo de álcool (La Vecchia et al., 1997). A grande maioria dos cânceres da cavidade oral são carcinomas epidermóides (Mognetti, 2006).

i) Carcinoma epidermóide oral

Carcinoma epidermóide de boca é uma neoplasia maligna derivada de células epiteliais de revestimento da mucosa oral, também conhecida como carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular. Sua nomenclatura se refere ao padrão histológico de diferenciação tumoral, que se assemelha ao epitélio de revestimento da pele (Driemel et al., 2007). São caracterizadas por neoplasias epiteliais invasivas que apresentam variado grau de diferenciação escamosa e propensão de emitir metástases para os nódulos linfáticos (Johnson et al., 2005).

(1)Epidemiologia

Já se sabe que o carcinoma epidermóide representa a grande maioria de todos os cânceres da mucosa oral (Canto e Devesa, 2002; Neville e Day, 2002; Johnson et al., 2005). Todavia, a avaliação separada das taxas de incidência para a cavidade oral e de orofaringe é complicada pela dificuldade de se designar o local de origem dos tumores, que se apresentam freqüentemente em estágios avançados (Johnson et al., 2005).

(i) Epidemiologia Global

A incidência de câncer oral e as taxas de mortalidade variam amplamente por região geográfica. As mais altas taxas são registradas em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Parkin et al., 1999; La Vecchia et al., 1997). Globalmente, cerca de 389.650 casos ocorreram no ano 2000, onde 266.672 foram de cavidade oral e 122.978 de orofaringe (Parkin et al., 2003).

Áreas caracterizadas por altas taxas de incidência de câncer oral (excluindo o câncer de lábio) são encontradas no sul e sudeste da Ásia (Índia, Paquistão, Bangladesh, Taiwan e Sri Lanka (La Vecchia et al., 1997; Warnakulasuriya, 2008), partes do oeste e leste Europeu (França, Hungria, Eslováquia e Eslovênia), regiões do Pacífico (Nova Guiné) e em regiões da América Latina e Caribe (Uruguai e Porto Rico), incluindo o Brasil (Warnakulasuriya, 2008).

Dentro da Europa também existe grande variação nas taxas de câncer oral, e diferenças consideráveis entre áreas de um mesmo país. Na maioria dos países, as taxas de mortalidade foram maiores que o dobro quando comparados dois anos mais recentes (1990 a 1992) com quatro anos mais antigos (1955 a 1959), denotando aumento da incidência dessa doença (La Vecchia et al., 1997). Em 2004, ocorreram 67.000 novos casos registrados nos países da União Européia, sendo o câncer oral e o de faringe o sétimo mais encontrado (Warnakulasuriya, 2008). Nestes países, a França tem a mais alta taxa de incidência nos anos recentes, ocorrendo por volta de 15.500 casos de câncer oral, de lábio e faringe diagnosticados anualmente, correspondendo a 5,5% das incidências de câncer no país (Warnakulasuriya, 2008). Espanha, Portugal, Alemanha, Suíça e regiões do norte da Itália relataram taxas intermediárias quando comparados com outros países da Europa (Warnakulasuriya, 2008).

Nos Estados Unidos, o câncer de orofaringe e o câncer da cavidade oral representam aproximadamente 3% de todas as malignidades nos homens e 2% de todas as malignidades em mulheres (Neville e Day, 2002). A Sociedade Americana de Câncer estimou que aproximadamente 22.000 novos casos de câncer oral seriam diagnosticados nos Estados Unidos em 1999, e que 6.000 pessoas morreriam antes deste diagnóstico (La Vecchia et al., 1997), já no ano de 2002, 28.900 novos casos e próximo de 7.400 morreram por essa doença (Warnakulasuriya, 2008).

Alguns dos países com as maiores taxas de incidência de câncer oral no mundo estão localizados na região do sul da Ásia. A Índia sempre foi citada como o país com a maior incidência no mundo, embora em alguns relatórios recentes, Sri Lanka e Paquistão são classificados no topo (Muwonge et al., 2008; Warnakulasuriya, 2008). Somente na Índia mais de 100.000 casos são registrados a cada ano, onde Bhopal, um de seus distritos, apresenta o mais alto índice para cânceres de ambos, língua (10,9 por 100.000) e boca (9,6 por 100.000 habitantes) em todo o mundo, seguida por Ahmedabad, com registros muito próximos aos mencionados (Warnakulasuriya 2008; Muwonge et al., 2008). Segundo Ferlay et al. (2004) o

Sri Lanka tem a maior incidência de câncer oral no Sul da Ásia, sendo o tipo mais comum nos homens com 15,5% de todos os cânceres relatados. Segundo Warnakulasuriya (2008), em uma visita a um centro de tratamento do câncer em qualquer um destes países com alto risco para a doença no sul da Ásia, é possível descobrir que pelo menos até um quarto dos pacientes internados sofrem de câncer oral. No Japão, leste da Ásia, o câncer oral é incomum. No ano de 2001, apresentou taxas de incidência de 5,3 por 100.000 habitantes (Ide et al., 2008).

Na América do Sul e no Caribe, o câncer de boca e de faringe são a quinta forma mais comum de neoplasia maligna em homens e a sexta entre as mulheres. Porto Rico tem a maior incidência relatada de câncer oral na região (maior que 15 por 10.000) (Wünsch-Filho e Camargo, 2001). Mundialmente, Cuba apresentou taxa intermediária de incidência para o câncer oral (Garrote et al., 2001), principalmente no sexo masculino, devido ao fumo de grandes quantidades de cachimbo e charuto, o que vem se mantendo estável por mais de uma década. As regiões que compreendem a Argentina, sul do Brasil e Uruguai tem os mais altos níveis de incidência na América do Sul, embora as mais altas taxas sejam efetivamente observadas no Brasil (Wunsch-Filho e Camargo, 2001).

Dados da África são limitados a poucos registros dos hospitais de câncer, sendo, portanto, difícil estimar a verdadeira incidência nestes países. Todavia, as taxas relatadas não mostram evidências de que câncer oral é um problema tão grave no continente Africano. Existem estudos descritivos a partir do Sudão que sugerem que as taxas de câncer oral em pacientes do sexo masculino são altas, ligando essa incidência ao “toombak”, produto que mistura rapé e bicarbonato de sódio, utilizado para mascar (Warnakulasuriya 2008).

(ii)Epidemiologia no Brasil

No ano de 2002, o câncer de mucosa oral representou a sexta maior incidência de neoplasias malignas na população masculina e a oitava entre as mulheres (INCA / MS, 2002), evoluindo recentemente para a quinta colocação entre homens e a sétima entre as mulheres (Wunsch-Filho, 2002; Warnakulasuriya 2008), fazendo com que a população masculina no Brasil tenha um dos mais altos riscos para o câncer oral em todo o mundo, atrás da França e da Índia (Wunsch-Filho e Camargo, 2001). Em 2002, o Instituto Nacional do Câncer estimou que seriam diagnosticados 11.255 novos casos de câncer de boca (INCA / MS, 2002). Já em 2008, 14.160 novos casos foram esperados (Warnakulasuriya 2008). Ainda, previa-se que

essas lesões fossem responsáveis por pelo menos 3.415 mortes anuais, desde o ano de 2002, com aproximadamente 80% atingindo pacientes homens. (INCA / MS, 2002).

Nos anos 90, as mais altas incidências para o câncer oral no continente americano foram registrados na cidade de São Paulo, tanto em homens quanto em mulheres, com taxas em mulheres similares às de mulheres negras americanas. As taxas de incidência em homens foram equivalentes àquelas observadas em outras áreas do mundo com altas incidências de câncer oral. As taxas entre homens e mulheres foram maiores na região sul (Wunsch-Filho, 2002).

Atualmente, a distribuição de novos casos é bastante heterogênea entre estados e capitais do país, sendo que cerca de 30% de todos os cânceres orais ocorrem nas capitais. Em geral, regiões Sul e Sudeste do país têm maiores taxas de câncer, enquanto Norte e Nordeste têm taxas mais baixas. Dos vários registros populacionais de câncer, São Paulo e Porto Alegre têm registrado taxas mais elevadas para o câncer da boca e língua (Warnakulasuriya, 2008).

(2)Fatores de risco

A etiologia do câncer oral é multifatorial. Baseada nas evidências globais disponíveis sobre os fatores de risco conhecidos, estes poderiam ser agrupados como estabelecidos, fortemente sugestivos, possíveis, e especulativos. Os mais importantes fatores etiológicos estabelecidos são o tabaco e o consumo excessivo de álcool (La Vecchia et al., 1997; Wunsch-filho 2002; Shiboski et al., 2000), relacionados com mais de 75% dos cânceres orais em países desenvolvidos (La Vecchia et al., 1997). Estes fatores propiciam riscos diretamente proporcionais ao tempo de uso e as quantidades ingeridas (Talamini et. al, 1990). Rothman (1980) relatou que enquanto cada um desses fatores pode isoladamente aumentar o risco em 2 a 3 vezes, quando usados em conjunto, este risco pode aumentar para 15 vezes.

Além desses fatores de risco, são citados como importantes o hábito de mascar folhas de betel, associados ou não a noz de areca ou a tabaco (Warnakulasuriya, 2008; Murti et al., 1995; Neville e Day, 2002; Mwuonge et al., 2008), o papilomavírus humano (Miller e White, 1996; Gillison e Shah, 2001; Neville e Day, 2002), fatores dietéticos (Winn, 1995; Neville e Day, 2002), o líquen plano oral (Silverman et al., 1991; Barnard et al., 1993), a anemia perniciosa (Neville e Day, 2002), e a imunossupressão (Flaitz et al., 1995; La Vecchia et al., 1997; Neville e Day, 2002), além de fatores genéticos (Boffetta e Hashibe, 2006).

Todos esses fatores podem agir de forma isolada ou em associações entre eles (Blot et al., 1988).

O câncer oral se tornou então, uma importante questão de saúde pública, pois sua ocorrência está fortemente associada com o fumo do cigarro e com a ingestão de bebidas alcoólicas, além de estar associado também, porém com menos frequência, à vários outros fatores conforme relatado neste trabalho, que, na maioria dos casos, podem provavelmente ser prevenidos com apropriada modificação de comportamento (Shiboski et al., 2000).

(a) Álcool

O álcool aumenta o risco de várias doenças não neoplásicas, dentre as quais cita-se: a polineuropatia alcoólica, cardiomiopatias alcoólicas, gastrite alcoólica, depressão e outras transtornos mentais (Rehm et al., 2004), hipertensão, acidente vascular cerebral hemorrágico (Keil et al., 1998; Boffetta e Hashibe, 2006), cirrose hepática e fibrose (Corrao et al., 1998), e pancreatite aguda e crônica (Thakker, 1998). Além disso, o consumo de álcool durante a gravidez está associado a vários efeitos adversos, incluindo álcoolismo fetal, aborto espontâneo, baixo peso ao nascer, nascimento prematuro, e retardo no crescimento intrauterino (Boffetta e Hashibe, 2006).

Um nexo de causalidade tem sido estabelecido entre o consumo de álcool e câncer da cavidade oral, faringe, esôfago, fígado, cólon, reto e mama feminina (Boyle et al., 2003). Para vários outros tipos de câncer, uma associação causal é suspeitada. Segundo Boffetta e Hashibe (2006) a relação de causa entre elevado consumo alcoólico e carcinoma epidermóide oral, faringe, laringe e esôfago, tem sido estudada desde o ano de 1950 e, desde então, investigadores têm avaliado diferenças na carcinogenicidade de bebidas alcoólicas em subsítios da cabeça e pescoço, com evidências sugerindo alto risco para sítios anatômicos em contato mais próximo com o álcool, como a parte móvel da língua e a hipofaringe.

A importância do álcool como um carcinógeno humano é frequentemente subestimada: o consumo está aumentando em muitos países como resultado tanto do aumento do número de consumidores de álcool quanto do aumento da quantidade de consumo individual, especialmente entre mulheres e em regiões de rápido crescimento econômico, como o leste da Ásia (Warnakulasuriya, 2008).

O álcool é eventualmente o responsável maior para o aumento do risco de câncer de cabeça e pescoço registrados em diversos países, especialmente na zona central e oriental da Europa (Bray et al., 2000). A evidência sugere que a susceptibilidade genética desempenha um papel importante na relação do álcool com o câncer, e conhecimentos dos possíveis mecanismos da ação carcinogênica do álcool tem aumentado nos últimos anos (Boffetta e Hashibe, 2006).

É encontrado na literatura que a ingestão crônica de bebidas alcoólicas pode ocasionar alterações morfológicas nos tecidos orais (Mascres et al., 1984; Maier et al., 1994; Harris et al., 2004). Mascres et al. (1984) observaram atrofia epitelial na mucosa esofageana de camundongos após exposição crônica de etanol e relataram uma diminuição do tamanho das células basais, sem alteração no número de camadas epiteliais. Também, em 1983, Muller et al., estudaram o efeito agudo e crônico em mucosa oral de coelhos e observaram que por um período curto de exposição, ocorria uma atrofia epitelial nesta mucosa e, após um período de 12 meses, notavam a presença de alterações displásicas, queratose, aumento da densidade celular na camada basal e um aumento do número de figuras mitóticas.

Nesta mesma linha de pesquisa, trabalhando com material de necropsia humana, Valentine et al. (1985) não observaram nenhuma alteração macroscópica nas línguas analisadas. Todavia, quando compararam indivíduos alcoólatras com indivíduos que consumiram bebidas alcoólicas somente em eventos sociais, observaram que no primeiro grupo, o epitélio lingual era mais estreito. Esta redução na espessura epitelial foi causada, segundo os autores, por uma diminuição do tamanho dessas células. Por outro lado, relatam também que a camada basal sofreu hipertrofia e hiperplasia celular. Essa hiperproliferação pode estar associada com o aumento da susceptibilidade para carcinogênese (Pösch e Seitz, 2004).

Dessa forma, o alcoolismo crônico promove uma atrofia da camada espinhosa do epitélio oral e, conjuntamente, uma proliferação das células da camada basal, podendo facilitar a passagem de agentes carcinogênicos por esse epitélio e o aumento da atividade proliferativa das células basais, possivelmente estando associado com o aumento da susceptibilidade para a carcinogênese (Maier et al., 1994).

Ao ser ingerido e penetrar nas células humanas, o álcool é metabolizado, originando espécies reativas de oxigênio, incluindo superóxidos, radicais de hidroxila e peróxido

hidrogenase, com acúmulo resultante desses radicais nos tecidos (Nordman, 1994). Dessa maneira, muitos estudos confirmam também que o álcool contribui de forma isolada para aumentar o risco em desenvolver o câncer de boca (Rothman, 1980; Johnson e Warnakulasuriya, 1993; Wight e Ogden, 1998). 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).

Recente trabalho desenvolvido por Visapaa et al. (2004) relata que pacientes que se apresentam em homozigose para o alelo ADH1C, gene responsável pela produção da enzima álcool desidrogenase, demonstram uma predisposição para desenvolver câncer de boca, apresentando altos níveis de acetaldeído na saliva após o consumo de álcool.

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; Navasumrit et al., 2001; Wight e Ogden, 1998).

c) Metalotioneína

A metalotioneína (MT) é uma proteína intracelular sem atividade enzimática que se liga a metais e é expressa em praticamente todos os organismos vivos, possuindo notável conservação evolutiva (Miles et al., 2000; Simpkins, 2000; Romero-Isart e Vasak, 2002; Cherian et al., 2003). Apresenta como principais características seu baixo peso molecular (60

a 70 Kda) e a acentuada capacidade de ligação a compostos ionizados, sendo notável sua afinidade por metais de transição (particularmente dos grupos 11 e 12 da tabela periódica dos elementos), e também a radicais livres (Romero-Isart e Vasak, 2002).

Em tecidos de mamíferos não expostos a excessos de metais não essenciais que apresentam alta afinidade de ligação à MT (prata, mercúrio e cádmio), essa se liga primariamente ao zinco e, secundariamente, ao cobre, considerados essenciais ao funcionamento celular (Romero-Isart e Vasak, 2002; Haq et al., 2003; Saber e Piskin, 2003). A intensidade da ligação entre a proteína e metais de transição é variável, tendo o cobre a maior afinidade, seguido pelo cádmio e pelo zinco (Miles et al., 2000; Coyle et al., 2002; Saber e Piskin, 2003). Dos cerca de 18 metais que podem se ligar à MT (característica única entre as metaloproteínas, da mesma maneira que a alta afinidade dessa ligação), apenas cobre, cádmio, chumbo, prata, mercúrio e bismuto, todos considerados tóxicos (a exceção do cobre), podem deslocar e substituir o zinco (Chan et al., 2002; Coyle et al., 2002).

A ligação de metais à MT é responsável pela sua conformação final, sabendo-se que a composição metálica é um dos determinantes da resistência à degradação da MT, que parece ser realizada principalmente por catepsinas (Mckim et al., 1992; Steinebach e Wolterbeek, 1992; Suhy et al., 1999; Miles et al., 2000; Coyle et al., 2002; Romero-Isart e Vasak, 2002). A notável preservação estrutural da MT entre diversas espécies, sendo a presença de proteínas semelhantes descrita mesmo nos mais simples e diferentes organismos, implica na conservação evolutiva de uma proteína com importantes funções (Miles et al., 2000).

A MT é sintetizada constitutivamente em diversos tecidos e desse fato resultou a idéia de que sua presença fosse essencial ao funcionamento celular normal (Palmeter, 1998). Entretanto foi observado desenvolvimento embrionário normal, bem como ausência de comprometimento orgânico em condições homeostáticas, exceto por tendência à obesidade, em animais experimentais que tiveram abolida a expressão de genes responsáveis pela codificação da MT. Sabe-se que essa proteína é uma das várias secretadas pelo tecido adiposo, fenômeno que tem alterado a visão metabólica sobre essas células (Trayhurn e Beattie, 2001).

Por outro lado, diversos tipos de estresse celular têm sido associados à indução da expressão da MT. Tais achados são indicativos da provável função protetora associada a ela, embora uma função única, que agrupe todos os diferentes tipos (quatro, apenas na espécie

humana) e isoformas dessa proteína, ainda não tenha sido descrita. Entretanto, diversas propriedades têm sido atribuídas à MT, incluindo neutralização de metais pesados, proteção tecidual contra diversas formas de estresse oxidativo e regulação da atividade de holoenzimas (Miles et al., 2000; Haq et al., 2003).

Recentemente, Leite et al. (2004) observaram que a proteína é expressa em células relacionadas a tatuagens bucais causadas por impregnação de amálgama de uso odontológico, lesão que tem sido considerada inócuas sistemicamente. Entretanto, apesar de ter sido a primeira e mais estudada função descrita da proteína, parece que essa não é a sua atividade biológica primordial, tendendo a ser considerada então apenas uma aquisição evolutiva fortuita (Palmiter, 1998; Coyle et al., 2002).

Existem ainda várias pesquisas sobre a proteção oferecida pela MT contra danos mediados por agentes oxidativos. Acredita-se que a proteína, quando exposta a ambiente celular oxidante, libere os átomos metálicos aos quais está ligada (como por exemplo o zinco que por sua vez inibe diretamente o dano oxidativo por diversas vias) e forme pontes dissulfeto intramoleculares, que são ávidas captadoras de elétrons, diminuindo o dano potencial dos radicais livres negativamente carregados, como as hidroxilas (Lazo et al., 1998; Romero-Isart e Vasak, 2002; Tapiero e Tew, 2003). Estudos *in vitro* têm demonstrado a neutralização de radicais livres após ligação à MT (Hussain et al., 1996; Quesada et al., 1996; Pitt et al., 1997; Theocharis et al., 2004).

Funções regulatórias também têm sido propostas para a MT, como por exemplo, a participação da proteína no processo apoptótico (Kim et al., 2003; Bours et al., 2000). Estudos apresentam possíveis associações da expressão da MT com a inibição da morte celular por apoptose. Células de camundongos Knockout para os genes MT-I e MT-II apresentam maior propensão a esse fenômeno quando provocadas por radiação ou por diversos tipos de fármacos, incluindo drogas oncoterápicas (Kondo et al., 1995; Kondo et al., 1997; Deng et al., 1999). Por outro lado, superexpressão da proteína coincide com a diminuição na ocorrência de apoptose em células normais e neoplásicas (Deng et al., 1998; Deng et al., 1999).

Alguns pesquisadores acreditam que a importação da MT para o núcleo, processo que é dependente de energia, esteja relacionada ao transporte de zinco para enzimas e fatores de transcrição envolvidos com a divisão celular (Palmiter, 1998; Fiscer e Davie, 1998; Coyle

et al., 2002). De fato, sua importação coincide com a elevação da concentração de zinco nesse subcompartimento da célula (Levadoux-Martin et al., 2001). Aumento na expressão da MT é observado em células com proliferação celular acelerada, em fases específicas do ciclo celular, e geralmente ocorre superexpressão da proteína em tumores quando comparados aos tecidos normais (Nagel e Vallee, 1995; Coyle et al., 2002). Também foi observado que a maior expressão de MT no citoplasma de células de carcinomas epidermóides de boca estava associada a pior prognóstico para pacientes, fato que pode estar relacionado ao aumento da proliferação celular nessas neoplasias (Woo et al., 1996; Cardoso, 2001).

O zinco possui propriedades antioxidantes e participa na regulação da apoptose, da inflamação e do funcionamento do sistema nervoso central (Vallee et al., 1991; Tapiero e Tew, 2003). Sua importância fisiológica pode ser também exemplificada pelo fato de ser esse o metal de transição presente em maior quantidade no corpo humano, há exceção do ferro (Tapiero e Tew, 2003). Dada a sua importância, diversos mecanismos devem existir para controlar sua absorção, distribuição, captação celular e excreção. A MT tem sido considerada a principal proteína relacionada à regulação da biodisponibilidade desse metal no ambiente intracelular, recebendo e doando zinco a outros componentes celulares, não somente quando este metal ultrapassa a quantidade essencial, mas também estocando o zinco em condições de escassez (Suhy et al., 1999).

i) Metalotioneína, álcool e câncer

Ainda que não completamente conhecido, muitos estudos sobre a metalotioneína citam sua importância em quadros de intoxicação e distribuição de metais, sua atuação em estresse oxidativo e na carcinogênese (Cherian et al., 2003; Waisberg et al., 2003; Theocharis et al, 2004). O motivo pelo qual a MT poderia ter alguma influência no mecanismo da carcinogênese deve-se à indução de seus genes por uma grande variedade de situações de estresse tecidual, particularmente relacionadas ao excesso de metais e à produção de radicais livres. Um outro motivo seria devido a sua acentuada capacidade de remoção de metais e de metabólitos potencialmente carcinogênicos (Cherian et al., 1993).

Após aplicação de agentes carcinogênicos (4NQO) na mucosa oral de camundongos, foi observado por Aguiar et al. (2004), um aumento da produção de MT. Foi observado

também uma superexpressão de MT nos tecidos gengivais de indivíduos com doença periodontal e fumantes (Katsuragi et al., 1997). Por outro lado, Santos et al. (2003), não observaram expressão da proteína em células obtidas por meio de raspagens da mucosa oral de indivíduos dependentes de álcool e, ou, fumo.

Uma pesquisa realizada em camundongos Knockout para a MT I e II , onde estes animais apresentaram-se mais sensíveis à intoxicação causada por metais pesados (cádmio e zinco) e por radicais livres (derivados do metabolismo do etanol), relacionou a proteína MT como um fator importante para a intoxicação de metais, estresse oxidativo e na carcinogênese (Satoh, 2004).

Entretanto, existem poucos relatos na literatura relacionados com a expressão da MT nas mucosas sob o efeito do álcool (Takano et al., 2000; Satoh, 2004). Em virtude deste fato, este trabalho se torna extremamente importante, considerando os poucos estudos sobre esse assunto relatados na literatura mundial.

3) OBJETIVOS

a) Objetivo geral

Investigar como o álcool exerce influência na proliferação e diferenciação da mucosa oral, à melhorar a compreensão sobre a gênese do carcinoma epidermóide oral.

b) Objetivos específicos

- Estabelecer modelo experimental que mimetize o consumo crônico de bebidas alcoólicas em humanos.
- Avaliar possíveis alterações morfológicas macro e microscópicas no epitélio lingual dos animais experimentais.
- Avaliar possíveis alterações moleculares, especificamente sobre a expressão da metalotioneína, nesse mesmo tecido.

4) MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo de estudo aqui relatado foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), e constitui parte de uma linha de pesquisa que tem por objetivo avaliar a correlação existente entre o consumo crônico de soluções de etanol e a carcinogênese oral. O experimento ocorreu nas instalações da Universidade Federal de Uberlândia, envolvendo o Laboratório de Experimentação Animal (LEA), onde os animais foram mantidos durante todo o experimento, e o Laboratório de Patologia Bucal, sede das demais etapas desta pesquisa.

a) Experimento de alcoolização

i) Animais

Foram empregados trinta camundongos machos C57BL/6, descritos como geneticamente susceptíveis ao alto consumo de álcool (Yoneyama et al., 2008) adquiridos na Universidade Estadual de Campinas (CEMIB / UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil). Os animais tinham entre 8 e 12 semanas de idade no começo do estudo e apresentaram um peso médio de 28,5 gramas (com variação de 20,2 a 33 gramas). Os animais foram colocados em gaiolas de policarbonato medindo cerca de 35 cm de comprimento por 25 cm de largura por 20 cm de altura, em grupos de cinco, sendo mantidos durante todo o experimento em ambiente ventilado, com temperatura controlada ($22\pm1^{\circ}\text{C}$) e respeitando o ciclo de claro / escuro de 12 / 12 horas (as luzes se acendiam as 7:00 horas e se apagavam as 19:00 horas). Ainda, os animais tiveram acesso livre a água e a ração apropriada (Nuvilab/CR1, Nuvital Nutrients LTDA, Brasil). Os bebedouros eram lavados a cada 5 dias e as gaiolas eram higienizadas a cada 7 dias, quando eram feitas as trocas da maravalha.

ii) Condições de manutenção experimental e adaptação

Os animais foram mantidos previamente ao início do experimento, durante 10 dias no mesmo local em que ocorreu o experimento, o LEA. Este período é necessário para acomodação e adaptação dos animais a possíveis diferenças de temperatura, luminosidade, barulhos, tamanho da gaiola e movimentação no ambiente, possivelmente diferentes dos

existentes no local em que foram reproduzidos (CEMIB / UNICAMP), bem como em se adaptar ao número de animais que foram mantidos na mesma gaiola.

iii) Consumo e adaptação ao álcool

Após a ambientação dos animais, iniciou-se a fase de adaptação da ingestão alcoólica, onde foram utilizadas soluções de etanol adicionada de sacarose (leite condensado a 5%). Para isso, 20 animais foram aleatoriamente submetidos a períodos seqüenciais de adaptação à ingestão alcoólica, utilizando-se solução de sacarose, 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. Durante todo o processo de adaptação da ingestão de etanol, os animais tiveram livre acesso à água e à ração.

Ao se atingir a concentração de 15% (V/V) de solução de etanol, dez animais foram aleatoriamente escolhidos para proceder a mais um período de 5 dias de adaptação à solução de etanol na concentração de 40%, acrescida, ainda, de sacarose na concentração de 5%. Nesta fase, todos os animais expostos à soluções de etanol, tanto na concentração de 15% quanto de 40%, permaneceram com a sacarose, na concentração de 5%, adicionada à solução alcoólica por um período de mais cinco dias, até que ocorreu então, a remoção da sacarose.

Este protocolo foi desenvolvido, inicialmente para 20 animais, até atingir a concentração de 15% da solução alcoólica. A partir deste ponto, somente dez animais continuaram com este protocolo, até se obter a concentração de 40% da solução de etanol. Outros dez animais foram mantidos somente com água e ração *ad libitum*, e foram denominados de grupo controle.

iv) Exposição experimental ao etanol

Cinco dias após ter atingido a concentração de 40% da solução de etanol, o que ocorreu posteriormente ao alcance da concentração de 15%, a sacarose foi retirada de todos os animais. Então, foram obtidos dois grupos que foram denominados de EtOH15% e EtOH40%. Estes animais ficaram expostos à soluções de etanol durante um período de seis meses, a contar do momento da retirada da sacarose, para desenvolvimento dos padrões de dependência alcoólica. Durante toda a fase experimental, foram sempre oferecidos aos animais água e ração *ad libitum*. O consumo das soluções de etanol e da água de todos os

animais foi monitorado durante todo o experimento, conseguindo assim, uma média de consumo do grupo ao longo dos seis meses.

A concentração final para os grupos experimentais foi determinada procurando-se mimetizar a exposição humana a bebidas fermentadas e destiladas.

v) Obtenção e processamento inicial das amostras teciduais

Ao final do período experimental, os animais foram sedados por exposição a éter etílico (VETEC, São Paulo – SP, Brasil) e então sacrificados por deslocamento cervical, seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, procurando reduzir ao máximo o sofrimento dos animais. Para a obtenção das amostras teciduais, que para este experimento foi considerada apenas a língua, foi realizada uma incisão em linha média na região abdominal, com exposição desta cavidade, envolvendo a região abdominal e torácica, que foi estendida até a região submentoniana. Para facilitar o acesso à língua, a mandíbula foi hemi-seccionada na região de sínfise. Em seguida, a língua foi tracionada superiormente com o auxílio de uma pinça anatômica, tendo sua base seccionada para a remoção de toda sua estrutura.

Num primeiro instante, observou-se havia a existência de alguma alteração morfológica superficial, como perda da integridade, alterações de contorno, consistência, textura e cor. Imediatamente após, os fragmentos de língua foram fixados em solução de formol na concentração de 10% por um período de 24 horas, procurando não ultrapassar este prazo. Estas peças foram então seccionadas no sentido perpendicular ao longo eixo da língua, em três partes, anterior, médio e posterior com espessura ântero-posterior similar, obtendo-se então amostras apicais, médias e posteriores do órgão. Estes fragmentos foram, mais adiante, incluídos de forma a permitir a observação dos segmentos epiteliais de borda e face ventral da língua.

Após o período de fixação, os fragmentos foram submetidos à desidratação, onde foram expostos à concentrações crescentes de alcoóis (50%, 70% e 100%). Após este processo, foi obtida a diafanização por duas passagens em xilol em temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram colocados em parafina a 60° C por um período de 40 minutos e posteriormente foram incluídos em blocos de parafina, que foram resfriados e aparados os excessos laterais. Após, esse blocos foram resfriados em temperaturas próximas

de 0° C e posteriormente, cortados em espessura de 3 μ m e colhidos em lâminas de vidro limpas e desengorduradas, e tratadas com silano (3-aminopropiltriethoxi-silano), para ensaios posteriores.

As lâminas contendo os cortes ficaram durante 40 minutos em uma estufa com temperatura controlada de 60° C para fixação dos cortes nas lâminas. Após esse período, as lâminas foram colocadas por três vezes em xanol para a remoção da parafina, mantendo o protocolo de cinco minutos para cada passagem. Em seguida, os cortes passaram por concentrações decrescentes de alcoóis e, por fim, em água corrente durante três minutos, até estarem bem hidratados.

Após, esses cortes foram colocados em hematoxilina de Harris por dois minutos, em seguida foram lavados em água corrente por cinco minutos e colocados em álcool na concentração de 80% por três minutos. Em seguida, foram colocados em solução de eosina por trinta segundos e lavados consecutivamente por álcool nas concentrações de 80%, 90% e três vezes no álcool absoluto, lavados em xanol por duas vezes e, assim, montado com lamínulas de vidro e Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

b) Avaliação histopatológica

Para cada camundongo, cinco cortes foram corados em hematoxilina e eosina e destas, apenas um foi selecionado para avaliação. O critério desta seleção foi avaliar o corte com melhor qualidade, maior definição de cores e maior integridade da região a ser avaliada. Inicialmente, foram avaliadas qualitativamente, em busca de possíveis alterações displásicas no tecido epitelial (Gale et al., 2005 IN Barnes et al., 2005), mediante uso de microscópio Nikon Eclipse E-400, em objetivas de 10 \times , 20 \times e 40 \times de magnificação. Em seguida, realizou-se morfometria do epitélio para identificar possíveis alterações hipertróficas e hiperplásicas que pudessem ser associadas ao consumo crônico de álcool. Para esse intento, foi eleita a porção ventro-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 no mesmo microscópio descrito anteriormente, em objetivas de 40 \times de magnificação. Do total de imagens obtidas, foram selecionadas dez imagens (compatível com a quantidade equivalente a 10 campos

histológicos em grande aumento. Um software específico (Motic Images Plus 2.0 ML, China) foi previamente calibrado com a utilização de uma imagem de uma régua calibradora obtida por meio de fotografia no mesmo microscópico e com a mesma magnificação final em que foram obtidas as imagens epiteliais, conforme descrito anteriormente, para se obter uma padronização das medidas em “ μm ”. Para cada imagem epitelial obtida, foram traçadas cinco linhas equidistantes e perpendiculares à camada basal do epitélio. Tais linhas partiram do pólo basal das células basais, idealmente seguindo o longo eixo dessas células, até o limite externo da camada epitelial. Então cada animal teve sua espessura epitelial aferida em cinquenta locais diferentes, de forma a se obter posteriormente, uma média desta espessura de cada animal, denominada como medida da espessura epitelial (Figura 1). Todas as análises microscópicas foram efetuadas pelo mesmo observador, de forma “cega”.

c) Avaliação imunoistoquímica da expressão de metalotioneína

i) Protocolo laboratorial

Para a evidenciação imunoistoquímica do antígeno metalotioneína no epitélio lingual, empregou-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase com a utilização do anticorpo monoclonal E9 (Dako, Carpinteria, CA, EUA), considerando-se a metodologia descrita a seguir (Boenisch, 2001; Cardoso *et al.*, 2002).

Inicialmente, cortes histológicos de 3 μm de espessura foram montados em lâminas de vidro previamente recobertas com organosilano (3-aminopropiltrietoxi-silano, Sigma Chemical Company, Saint Louis, EUA). Após desparafinação por três passagens em soluções de xanol, realizadas à temperatura ambiente por 18 horas, 15 minutos e mais cinco minutos, respectivamente, os cortes histológicos foram hidratados em soluções aquosas de concentrações descendentes de etanol (100%, 90% e 70%, cinco minutos cada banho) e então tiveram a atividade endógena de peroxidase e de biotina bloqueadas com solução de H₂O₂ a 10% ou solução comercial (Dako), respectivamente.

Posteriormente, os cortes foram submetidos a tratamento com tampão EDTA (EthyleneDiamine Tetraacetic Acid), 1M, pH 8,2, em ambiente de 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 epítopo antigênico pesquisado.

Após resfriamento, alcançando o equilíbrio térmico com o ambiente, os cortes foram lavados em água destilada e procedeu-se a incubação com os anticorpos primários mencionados, diluídos (1:800) em tampão TRIS, pH 7,4, realizada em câmara úmida, à temperatura ambiente, overnight, por 19 horas. Após lavagem em água destilada, os cortes foram incubados em anticorpo secundário biotinilado 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.

A revelação da reação foi desenvolvida a partir de solução cromógena contendo 12mg de diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluída em 120ml de tampão TRIS-HCl, pH 7,4, passada em filtro duplo. Após a filtragem, adicionou-se 1,2ml de peróxido de hidrogênio a 10 V, incubando-se os cortes nessa solução durante três minutos. Em seqüência, os cortes foram lavados em água corrente, por cinco minutos.

Os cortes foram então contra-corados pela hematoxilina de Mayer, por 3 minutos, desidratados em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e três vezes a 100%), diafanizados em três banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Carcinomas ductais de mama com reatividade previamente reconhecida para metalotioneína foram utilizados como controle positivo, e a omissão dos anticorpos primários foi empregada como controle negativo.

ii) Análise

Para análise quantitativa da marcação da metalotioneína, procedeu-se a uma rotina similar à descrita para a avaliação dos cortes coradas em hematoxilina e eosina, porém com algumas variações.

Para cada camundongo, dois cortes foram submetidos ao protocolo da reação imunoistoquímica para detecção da MT, sendo que, apenas um deles foi selecionado para avaliação. O critério desta seleção, da mesma forma como ocorreu nos cortes corados por HE, foi avaliar o corte com melhor qualidade, maior definição de cores e maior integridade da região a ser avaliada. Mediante uso de microscópio Nikon Eclipse E-400 e em uma magnificação final de 1600 \times , foi avaliado o percentual de marcação da MT no epitélio

lingual, na mesma região em que foram analisadas histopatologicamente (porção ventrolateral).

Semelhante ao ocorrido no estudo anterior, cada amostra teve toda essa extensão fotografada no mesmo microscópio descrito anteriormente, em objetivas de 40 \times de magnificação. Do total de imagens obtidas, foram selecionadas dez imagens (compatível com a quantidade equivalente a dez campos histológicos em grande aumento). Um software específico (Motic Images Plus 2.0 ML, China) foi previamente calibrado com a utilização de uma imagem de uma régua calibradora obtida por meio de fotografia no mesmo microscópico e com a mesma magnificação final em que foram obtidas as imagens epiteliais, conforme descrito anteriormente, para se obter uma padronização das medidas em “ μ m”. Para cada imagem epitelial obtida, foram traçadas cinco linhas equidistantes e perpendiculares à camada basal do epitélio (Figura 2). Tais linhas partiram do aspecto basal das células basais, idealmente seguindo o longo eixo dessas células, até o limite externo da camada epitelial. Para cada linha obtida demarcando a espessura total do epitélio, uma linha paralela e imediatamente lateral foi traçada, demarcando somente a área do epitélio que apresentou a marcação da proteína MT (espessura positiva). Como via de regra, foi definido como marcação positiva para a MT as regiões que apresentaram colorações acastanhadas de intensidade forte e moderada, sendo descartadas as regiões que apresentaram essa coloração com intensidade muito baixa.

Considerando que cada animal teve sua espessura epitelial demarcada em cinquenta locais diferentes e, consequentemente cinqüenta regiões avaliadas em relação à marcação da MT, foi calculado a proporção entre a espessura positiva e a espessura total, dividindo o valor marcado positivamente pelo valor obtido da espessura epitelial total. Finalmente foi obtida a média de marcação positiva para a MT, denominada de índice de marcação (Figura 2). Todas as análises microscópicas foram efetuadas pelo mesmo observador, de forma “cega”.

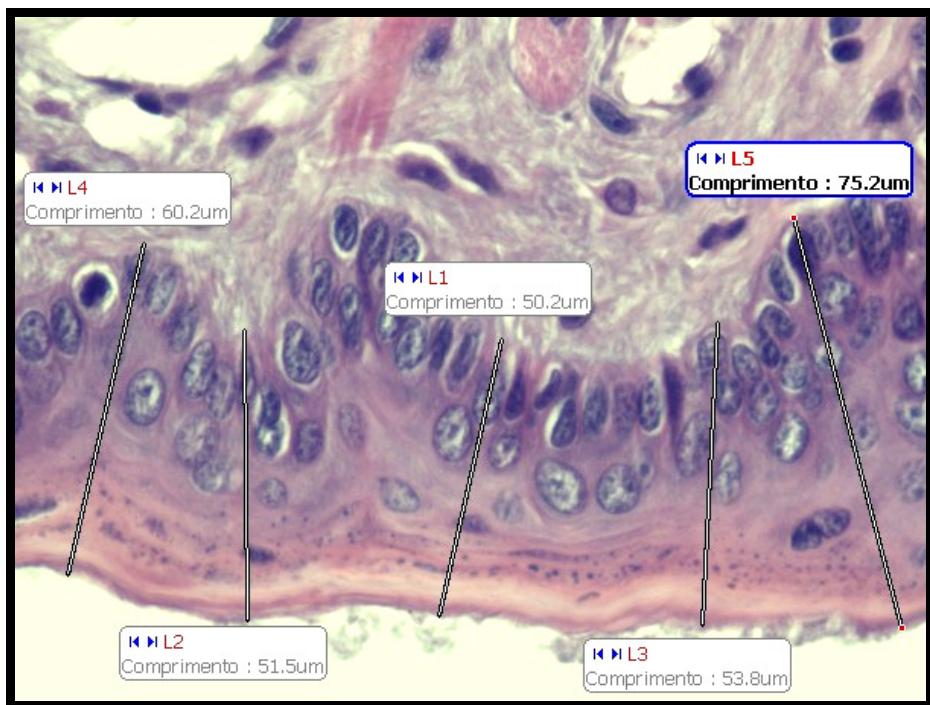


Figura 1 - Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6, corada por hematoxilina e eosina. Observa-se na figura a representação gráfica do procedimento empregado para a mensuração do epitélio (magnificação original: 1600x). Observa-se que em cada campo de imagem, 5 retas foram traçadas, ressaltando que, para cada animal, 10 campos de imagem foram mensurados.

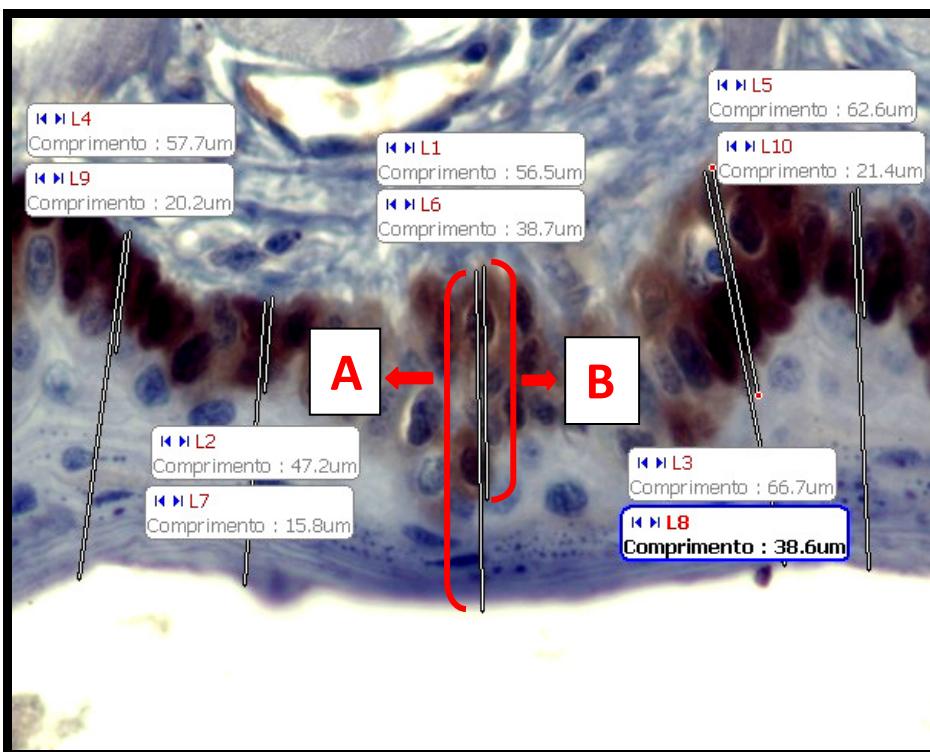


Figura 2 - Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6, mostrando marcação imunoistoquímica de metalotioneína. Observa-se na figura a representação gráfica do procedimento empregado para a mensuração da marcação positiva da MT (estreptavidina-biotina-peroxidase; magnificação original: 1600x). A) O comprimento total do epitélio; B) Área marcada positivamente para a MT. Dividindo-se o valor de “B” pelo valor de “A” será obtida a porcentagem marcada positivamente para a MT.

5) RESULTADOS

Durante todo o experimento, o consumo de todos os animais, tanto em relação à água, quanto em relação às soluções alcoólicas foram mensurados periodicamente. Os animais do grupo EtOH40% consumiram, em média, cerca de 60% mais solução alcoólica que os do grupo EtOH15%. Consequentemente, houve também um consumo específico de etanol maior para o grupo EtOH40%, cerca de quatro vezes mais em relação ao grupo EtOH15%.

De forma similar ao ocorrido com o consumo das soluções de etanol, o consumo de água também foi diferente entre os grupos avaliados, observando um maior consumo também para os animais do grupo EtOH40%. Porém, a diferença na média de consumo entre este último grupo e o EtOH15% foi insignificante (Tabela 1).

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

Grupo	Consumo médio diário (mL)		
	Água	Solução alcoólica	Etanol*
EtOH15%	3,5	2,3	0,4
EtOH40%	3,7	3,7	1,5

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

a) Análise qualitativa dos achados macroscópicos e microscópicos dos epitélios linguais corados em hematoxilina e eosina

Macroscopicamente, por meio da análise qualitativa, não foram encontradas nenhuma alteração evidente em relação à perda de integridade, alterações do contorno, consistência, textura ou coloração nas línguas dos animais avaliados.

Da mesma forma como ocorrido, não foram encontradas alterações microscópicas compatíveis com displasia epitelial ou qualquer outra lesão caracterizável morfologicamente para esse tecido. Ainda, o epitélio mostrou estrutura usual, com boa definição das camadas basal, parabasal, espinhosa e pavimentosa, em todos os animais, de todos os grupos. Aparentemente, as células basais e parabasais se apresentavam com o mesmo tamanho e formato nos três grupos estudados.

b) Avaliação morfométrica do epitélio

Determinados pontos do epitélio foram mensurados, conforme a técnica descrita anteriormente, onde foram obtidos valores de média dessa espessura para cada animal, e, posteriormente, para cada grupo.

Quantitativamente, observou-se que a espessura epitelial total foi muito similar entre os grupos avaliados (média de $60,8 \pm 6,3\mu\text{m}$ 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 no Gráfico 1.

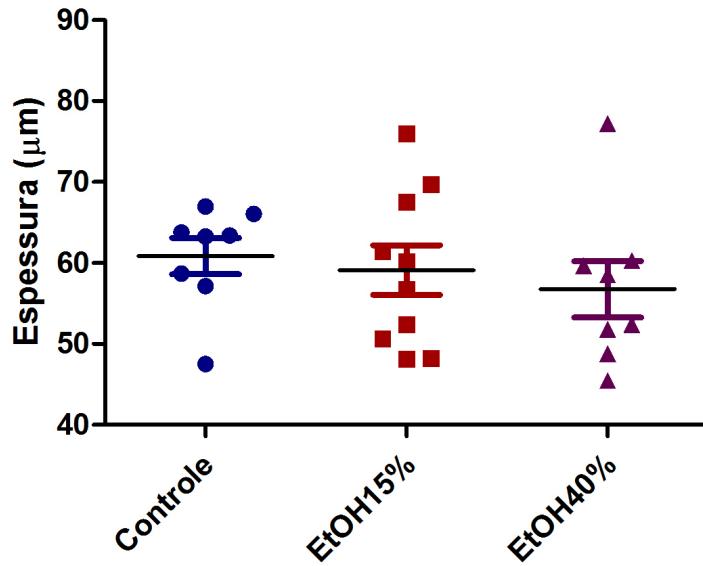


Gráfico 1 – Diagrama de barras e suíças representando os resultados das mensurações de espessura total do epitélio lingual. Distribuição dos animais avaliados, segundo grupo e espessura epitelial (em μm) da região ventro-lateral da língua (barras centrais = média; suíças = desvio-padrão). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos avaliados, com $p=0,48$ (teste de Kruskal-Wallis).

c) Expressão imunoistoquímica da metalotioneína

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 no tecido epitelial e foi localizada basicamente nas camadas basal e parabasal. Em geral, a marcação foi citoplasmática e nuclear concomitantemente, conforme mostrado nas Figuras 3 a 5.

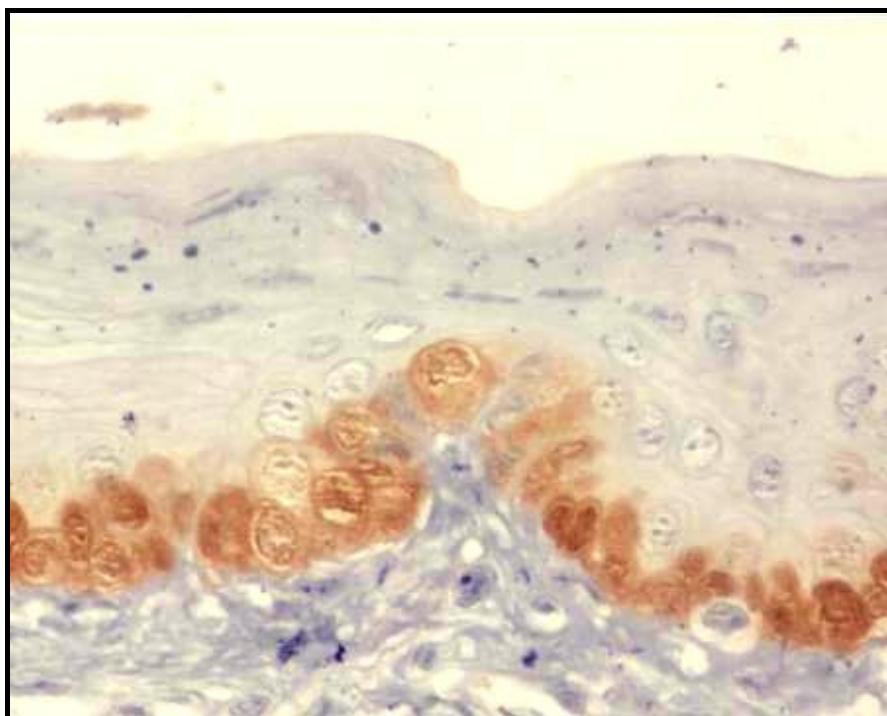


Figura 3 – Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6 do grupo controle, mostrando marcação imunoistoquímica de metalotioneína. Observa-se coloração de intensidade moderada a forte, localizada com maior freqüência no citoplasma mas também no núcleo, basicamente nas camadas basal e parabasal (estreptavidina-biotina-peroxidase; magnificação original: 500×).

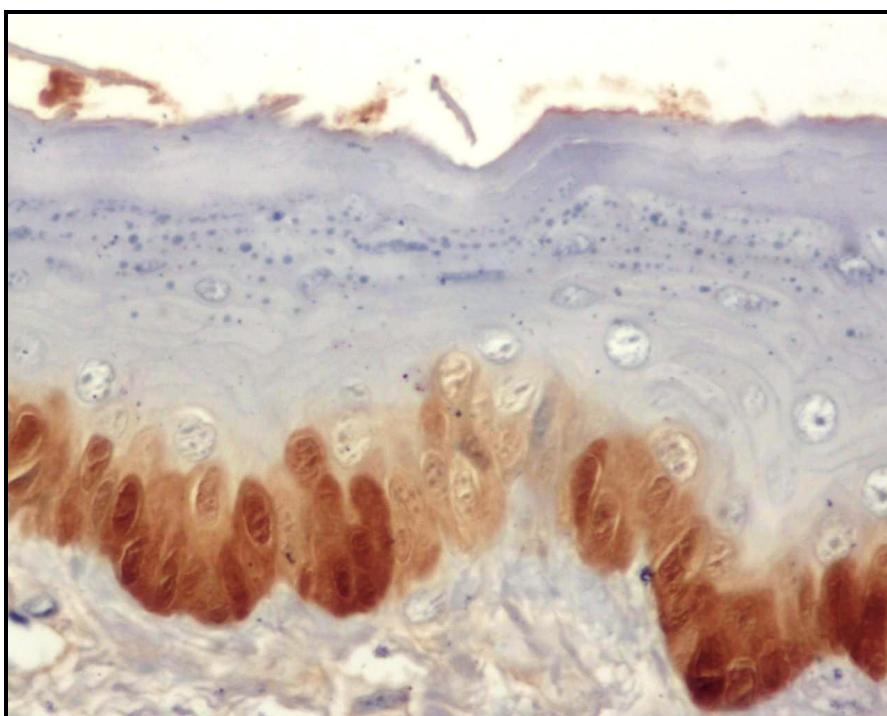


Figura 4 - Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6 do grupo EtOH15%, mostrando marcação imunoistoquímica de metalotioneína. Observa-se coloração de intensidade fraca a forte, localizada com maior freqüência no citoplasma e no núcleo, basicamente nas camadas basal e parabasal (estreptavidina-biotina-peroxidase; magnificação original: 500×).

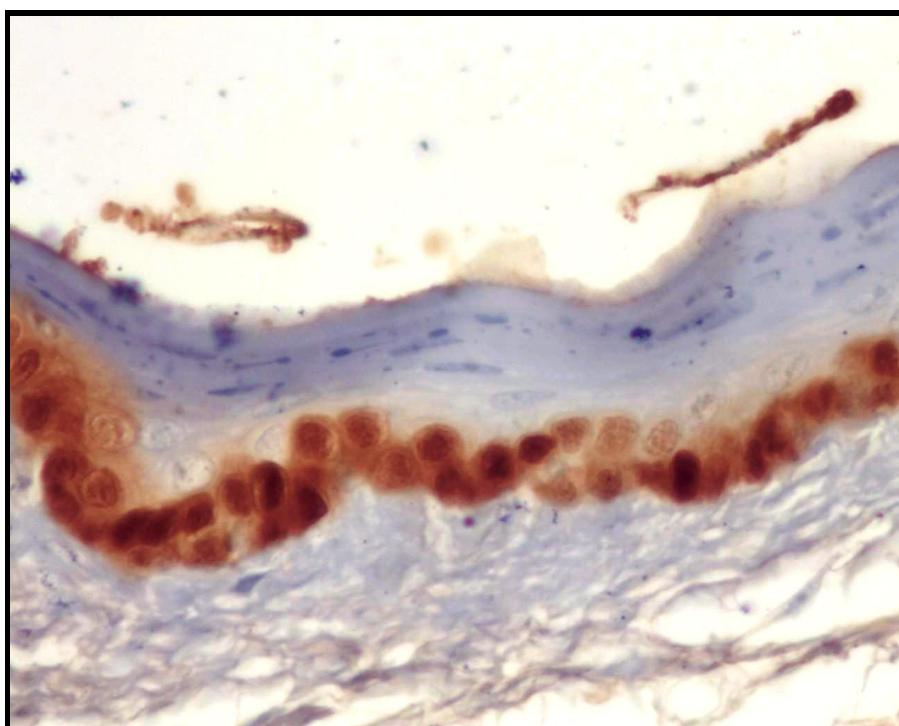


Figura 5 - Segmento de mucosa ventrolateral da língua de camundongo C57BL/6 do grupo EtOH40%, mostrando marcação imunoistoquímica de metalotioneína. Observa-se coloração de intensidade fraca a moderada, localizada com maior freqüência no citoplasma mas também no núcleo, basicamente nas camadas basal e parabasal (estreptavidina-biotina-peroxidase; magnificação original: 500×).

d) Avaliação morfológica da expressão da metalotioneína

Por meio da técnica utilizada para definição da quantidade de marcação positiva para a MT no epitélio lingual de todos os grupos estudados, foi obtida a percentagem média da expressão da MT para cada animal, e, posteriormente, para cada grupo.

De forma similar ao observado na análise da espessura epitelial, quantitativamente, observou-se que o índice de marcação imunoistoquímica 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 no Gráfico 2.

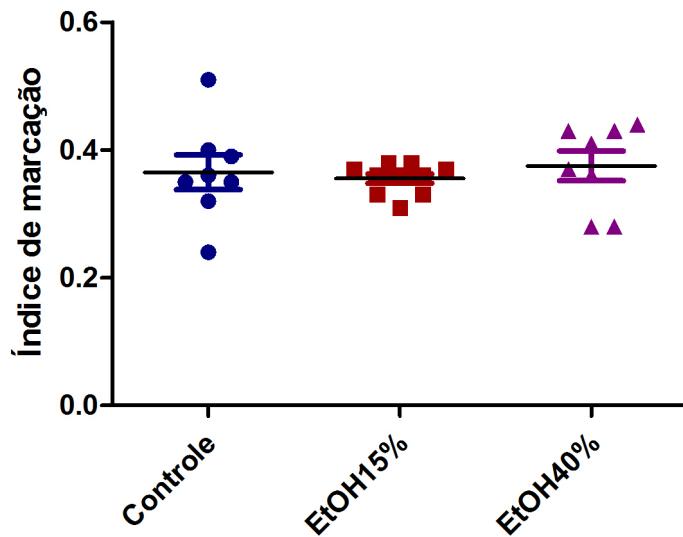


Gráfico 2 – Diagrama de barras e suíças representando os resultados dos índices de marcação imunoistoquímica do antígeno para MT no epitélio lingual. Distribuição dos animais avaliados, segundo grupo e índice de marcação imunoistoquímica da metalotioneína na região ventro-lateral da língua (barras centrais = média; suíças = desvio-padrão). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os três grupos avaliados, com $p=0,56$ (teste de Kruskal-Wallis).

e) Avaliação morfométrica do epitélio em relação à avaliação morfológica da expressão da metalotioneína

Utilizando-se das técnicas descritas para avaliação da espessura média do epitélio e para a definição do índice de espessura de marcação para a MT, foi definido, mais um parâmetro de avaliação, onde foi analisada a correlação existente entre a espessura epitelial, inicialmente mensurada em hematoxilina e eosina, e o índice de marcação imunoistoquímica do antígeno MT.

Finalmente, não houve qualquer correlação significativa entre a espessura epitelial e o índice de marcação da metalotioneína, tanto quanto avaliados todos os animais em um único conjunto quanto avaliados por grupos, como mostrado no Gráfico 3.

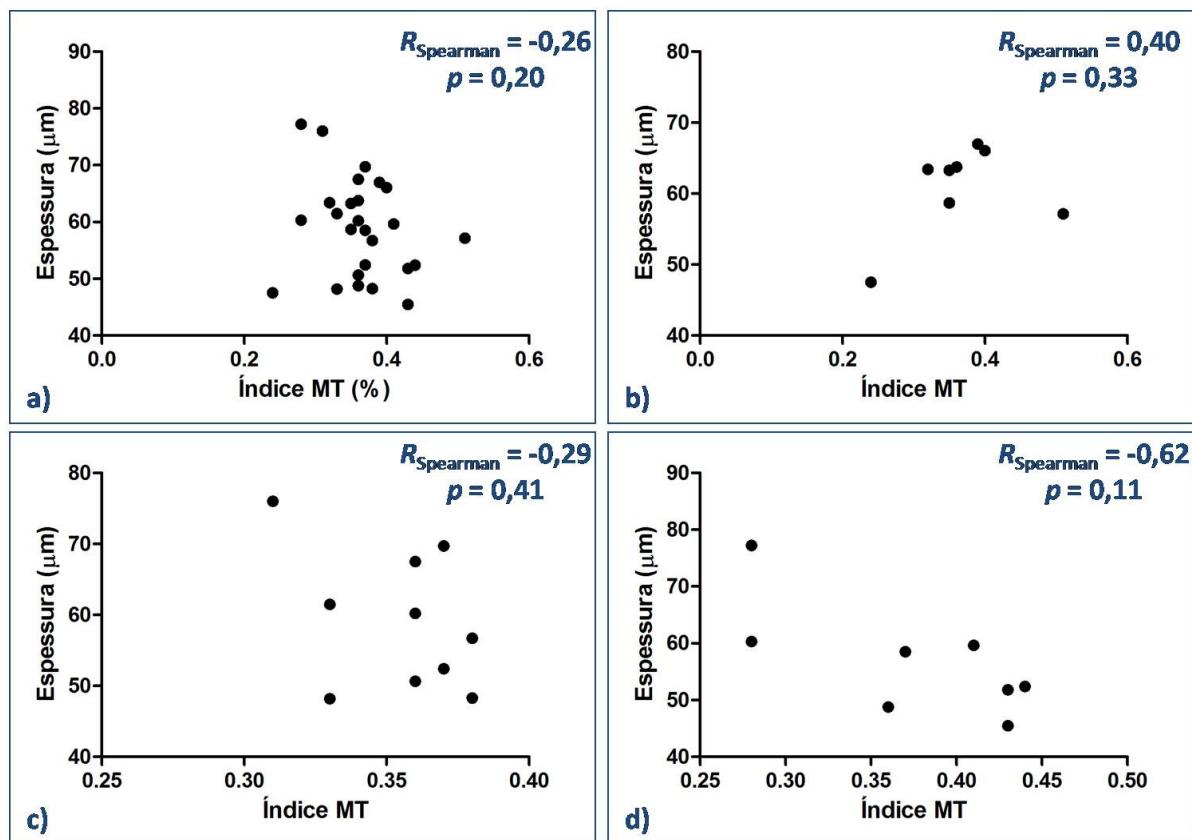


Gráfico 3 – Análise de correlação entre a espessura (avaliada em hematoxilina e eosina) e o índice de marcação imunoistoquímica do antígeno metalotioneína no epitélio lingual ventro-lateral: a) de todos os animais dos três grupos avaliados; b) dos animais do grupo controle; c) dos animais do grupo EtHO15%; d) dos animais do grupo EtOH40%.

6) DISCUSSÃO

No presente estudo, foi investigado, por meio da análise morfométrica, a espessura média total do epitélio lingual e a expressão da metalotioneína em camundongos submetidos a alcoolização crônica por um período de seis meses.

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. Este trabalho 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.

O tabaco e o álcool têm sido bastante associados, em vários estudos, como fatores de risco para o câncer do trato aerodigestivo superior (Franceschi et al., 1990). Várias investigações têm abordado especificamente a interação do tabaco e do álcool na etiologia do câncer da cavidade oral, faringe, laringe e esôfago (Franceschi et al., 1990; Elwood et al., 1984). Embora a natureza da interação biológica entre estes dois fatores não tenha sido definitivamente estabelecida, riscos multiplicativos ou aditivos parecem ser plausíveis. Separar os efeitos do álcool e do tabaco continua a ser, entretanto, um problema difícil, uma vez que consumidores de bebidas alcoólicas em grande quantidade tendem a ser fumantes em grande quantidade e vice-versa. Além disso, poucas pessoas que não bebem e não fumam, foram identificados em estudos etiológicos de câncer de trato aerodigestivo superior (Franceschi et al., 1990).

A escolha em se fazer um trabalho experimental utilizando-se camundongos tem por objetivo excluir algumas variáveis que não estivessem relacionadas ao consumo de álcool, como por exemplo, o fumo e/ou dieta pobre em nutrientes (Valentine et al., 1985).

Deve ser também analisado que diferentes tipos de bebidas alcoólicas ingeridas por etilistas (podendo ser fermentadas e/ou destiladas) têm concentrações alcoólicas diferenciadas. Sabe-se que dificilmente um indivíduo que possui hábitos de alcoolismo consome somente um tipo de bebida, o que dificultaria a separação de grupos de acordo com a concentração das bebidas ingeridas (Wight e Ogden, 1998; Figueiredo-Ruiz et al., 2004).

Dessa forma, desenvolvendo um estudo com animais, foi possível controlar a dieta, determinar a concentração, a duração e a quantidade de etanol ingerida, obtendo assim, o efeito do álcool na mucosa oral, de maneira mais fiel, sem que ocorram interferências do meio externo.

Fatores de risco individuais que contribuem para o desenvolvimento do abuso do álcool e do alcoolismo não estão completamente esclarecidos. Entre fatores biológico, psicológico e sociais, foi estimado que os fatores genéticos respondem por aproximadamente 40-60% do risco de desenvolvimento de alcoolismo (Camarini e Hodge, 2004).

Mesmo não havendo na literatura critérios universalmente aceitos para caracterizar a situação de alcoolismo crônico, existe um consenso que o uso habitual e continuado de bebidas alcoólicas acima de 80 gramas de etanol por dia para seres humanos, estaria associado ao aparecimento de doenças no sistema nervoso central e sistema digestivo (Neves et al., 1989). Todavia, não há relatos sobre o período mínimo necessário para criar condições de dependência.

Por outro lado, foi escolhido o período de consumo de seis meses, pois este tempo corresponde a aproximadamente 20 anos de exposição contínua na espécie humana, sendo equiparado a pouco mais de um terço da expectativa de vida dos animais, ainda que tal comparação careça de maior rigor científico (Chorilli et al., 2007). Entretanto, 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, 2005; Izotti et al., 1998).

Como critério para escolha das dosagens que seriam utilizadas neste experimento, foram selecionadas concentrações que corresponderiam a bebidas fermentadas e bebidas destiladas, tendo por base, o que ocorre com humanos. Segundo Neves et al. (1989) a concentração de etanol para bebidas fermentadas variam de 5% a 15%, sendo a cerveja e o vinho os maiores representantes deste grupo. Contudo, optou-se pela escolha da concentração de 15% de solução alcoólica neste experimento para um dos grupos (EtOH15%), considerando-se que a concentração de 15% mimetizaria bebidas fermentadas com alto teor alcoólico.

Já a concentração de etanol para as bebidas destiladas, varia de 37% a 42% (Neves et al., 1989), tendo como representantes principais a vodka e o whisky em nível mundial, e, no Brasil, a cachaça. Deste modo, foi feita, então, a seleção da concentração de 40% de solução de etanol para um dos grupos (EtOH40%). Todavia, Spanagel (2003), em um artigo que discorre sobre modelos de experimentação envolvendo animais e ingestão de soluções de etanol, comenta que roedores consomem voluntariamente até a concentração de 40% de etanol. 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).

Vários artigos relatando aspectos sobre a permeabilidade da membrana da mucosa oral foram publicados. Eles têm sugerido que o etanol pode aumentar a penetração de carcinógenos através da mucosa oral. Isto pode ocorrer devido a passagem intercelular de carcinógenos, ou talvez com o aumento da permeabilidade desta mucosa (Ogden, 2005; Ogden e Wigth, 1998; Squier, 1991). Tem sido sugerido que o etanol mais diluído (15%) pode ser mais eficaz do que em maiores concentrações (por exemplo, 40%) porque este último pode atuar como um fixador químico, reduzindo assim a permeabilidade (Squier, 1991). Estas informações foram importantes para que fossem definidas as concentrações de etanol a serem utilizadas neste experimento.

Foi interessante observar neste trabalho que os animais expostos a uma dieta com maior concentração de etanol também consumiram quantidades maiores de água. Tal fator pode estar associado à 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).

Nos animais, variáveis genéticas e ambientais parecem influenciar interativamente as diferenças individuais na auto-administração de álcool. Existem vários modelos descritos na literatura em que foram avaliados os efeitos do etanol sobre a mucosa oral 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 (Maier et al., 1994; Al-Damouk, 1993; Sofritti et al., 2002; Maito et al., 2003). A cepa C57/BL6 de camundongos tem sido descrita como particularmente suscetível ao consumo crônico de álcool, em maiores quantidades (Camarini e Hodge, 2004; Yoneyama, et al., 2008).

O presente estudo foi concebido respeitando estes parâmetros, mantendo os animais em condições de temperatura e ciclo claro/escuro semelhante às encontradas em meio externo, seguindo parâmetros que são considerados adequados para essa espécie (Chorilli et al., 2007). Além disso, foram utilizados animais com predisposição genética ao consumo de etanol (Camarini e Hodge, 2004).

Não foram evidenciadas alterações macroscópicas durante a análise da mucosa lingual dos camundongos neste experimento. Nesse sentido, é importante enfatizar que, de fato, não eram esperadas tais alterações, tais como a formação de tumores ou de lesões cancerizáveis (como leucoplasia), tendo em vista que estudos anteriores não evidenciaram lesões (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.

Em outro aspecto metodológico, relacionado à morfometria, foi avaliada a espessura média total do epitélio. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os animais do grupo controle e os animais submetidos à ingestão de soluções de etanol. Da mesma forma ocorreu quando comparados os grupos de animais expostos às diferentes concentrações das soluções de etanol. Os resultados obtidos neste trabalho divergem de alguns trabalhos disponíveis na literatura realizados em humanos, os quais observaram alterações hipotróficas em mucosas expostas ao contato com o álcool, através da redução da camada espinhosa (Valentine et al., 1985; Seitz et al., 2001). Neste sentido, Wight e Ogden (1998) afirmaram que estas alterações podem inclusive aumentar a permeabilidade do tecido a agentes carcinógenos (Maier et al., 1994). Dessa forma, tal resultado sugere que não houve efeito significativo resultante da exposição das soluções de etanol, ao epitélio.

De forma semelhante ao observado nos resultados obtidos neste trabalho, Maier et al. (1994) observaram apenas uma tendência a diminuição do epitélio da borda e da base da língua, quando estudaram o efeito do consumo crônico de álcool, durante o mesmo período de seis meses, expostos à esta mesma mucosa, em camundongos, porém, com uma concentração da solução de etanol inferior às que foram utilizadas em neste presente estudo. Compatível com os resultados obtidos neste trabalho, estes autores concluíram que não houve diferenças estatisticamente significantes quando comparados o grupo alcoolizado com o grupo controle (não alcoolizado).

Entretanto, estudos sugerem divergências nestes resultados. Acredita-se que essas diferenças possam ser devido ao tempo de ingestão do etanol. Neste sentido, foi suposto que a ingestão aguda levaria a uma resposta imediata do organismo, traduzida por hipotrofia epitelial. Por outro lado, ingestão crônica levaria ao aumento dos níveis de acetaldeído na saliva que, em contato com a mucosa, induziria atividade hiperproliferativa do epitélio (Homann et al., 1997), podendo resultar em aumento de espessura desse epitélio.

Quanto à imunomarcação da MT nos animais avaliados, não foram encontradas diferenças significativas entre os animais alcoolizados e os animais do grupo controle. Analisando o índice de marcação da proteína, foi observado, também, que não houve diferenças estatisticamente significantes quando comparados, entre si, os grupos alcoolizados nas diferentes concentrações.

Este estudo evoluiu de forma contrária à encontrada em diversos trabalhos, que têm mostrado resultados onde a expressão da MT se encontra geralmente acentuada em tecidos expostos a variados tipos de agressão (Satoh, 2004; Loney et al., 2004; Tomita et al., 2004).

Muitas evidências sugerem o papel citoprotetor da MT frente à diferentes agressões. Um trabalho experimental realizado por Takano et al. (2000) onde camundongos selvagens e knockout foram tratados com etanol por via oral de forma aguda, foi observado marcação como o antígeno para MT no grupo controle (animais selvagens). Dessa forma, frente à agressão causada pela exposição dos animais às soluções alcoólicas durante este experimento, esperava-se encontrar alguma alteração em relação à quantidade de expressão de MT no epitélio lingual, sabendo que o álcool causaria uma agressão, pelo contato crônico e de forma direta, a este epitélio.

Muitas evidências sugerem atuação da MT no desenvolvimento do câncer, bem como no desenvolvimento de resistência ao tratamento oncológico e, consequentemente, no prognóstico da doença (Theocharis et al., 2003; Jasani e Schmid, 1997). A indução da síntese de MT por citocinas, hormônios e outros agentes citotóxicos é indicativo do seu envolvimento na proliferação e diferenciação celular, e ainda nos mecanismos de defesa celular. Estudos têm relatado a expressão imunohistoquímica da MT em vários tumores humanos, associados ou com os processos de carcinogênese relatados ou com a resistência contra a radiação e a quimioterapia (Jasani e Schmid, 1997). A expressão da MT nos tecidos tumorais tem sido, sobretudo, correlacionada com células tumorais com capacidade

proliferativa ou com indução da apoptose (Theocharis et al., 2004), e foi considerada como um ciclo celular dependente, sendo usada como um marcador de proliferação celular em certos tipos de tumores (Cherian et al., 1994). Alguns estudos têm examinado a expressão da MT em certos tipos de câncer em relação aos parâmetros clínico-patológicos, capacidade de proliferação do tumor, apoptose, resistência à drogas e à radiação e sobrevivência do paciente (Theocharis et al., 2004).

No epitélio normal de revestimento da mucosa oral, a MT está localizada apenas na divisão das células entre as camadas basal e parabasal. Nos ninhos de carcinomas bem diferenciados, MT foi observada perifericamente às células tumorais localizadas, mas não no centro dos ninhos, onde um aumento da taxa de apoptose foi encontrado. Áreas menos diferenciadas apresentando metalotioneína positivamente, mas com pouca apoptose, sugeriram que a metalotioneína pode inibir as células a entrar em apoptose, tanto no epitélio normal próximo da base quanto em regiões menos diferenciadas de carcinoma de células escamosas da língua (Theocharis et al., 2004). Imunorreatividade citoplasmática e nuclear de metalotioneína foi notada em carcinoma de células escamosas da região oral e de faringe e nas células da região do seio maxilar (Theocharis et al., 2004). No presente estudo, a evidenciação imunoistoquímica da metalotioneína foi realizada para análise da quantidade de marcação por esta proteína no epitélio, a fim de estabelecer uma relação quantitativa da expressão da metalotioneína nos grupos expostos ao etanol em relação ao controle, associando esta expressão da MT ao surgimento de neoplasias na língua de camundongos, pelo trauma sofrido.

Ao contrário do ocorrido em diversos trabalhos com animais semelhantes (Zhou et al., 2002; Lambert et al., 2004) e em pesquisas em humanos (Szelachowska et al., 2009), a marcação da expressão da metalotioneína encontrada neste experimento, entre os grupos expostos às soluções de etanol, não houve diferenças significativas, ou seja, a quantidade de marcação encontrada no grupo EtOH15% foi muito próxima da quantidade encontrada no grupo EtOH40%. O mesmo foi encontrado quando comparados estes grupos expostos ao etanol com o grupo controle, não havendo também diferenças quantitativas significantes entre todos os grupos estudados. Dessa forma, não foram evidenciadas relações entre o consumo crônico de soluções de etanol em diferentes concentrações com carcinogênese de língua nesta pesquisa.

É sabido que radicais livres são produzidos durante o metabolismo do álcool (Maier et al., 1994; Zhou et al., 2002). Em contrapartida, acredita-se que uma das principais funções

da MT seja sua ligação a radicais livres e a outros agentes citotóxicos que possam estar presentes no meio intracelular. Dadas as características bioquímicas da proteína, as espécies moleculares reativas são rapidamente imobilizadas, impedindo que as mesmas possam causar dano à célula (Loney et al., 2003; Lambert et al., 2004; Satoh, 2004). Assim, de acordo com essas conclusões, esperava-se que a expressão da MT fosse maior e aumentasse proporcionalmente ao consumo na medida em que a concentração de etanol ingerida fosse também aumentada. Todavia, os resultados contrariaram a hipótese proposta neste estudo, que foi estipulada anteriormente.

Desta forma, sugere-se que novos experimentos venham a ocorrer, de forma a alterar algumas variáveis, como tempo de exposição dos animais a soluções de etanol e concentrações alcoólica das soluções, de forma a tentar explicar o motivo pelo qual a expressão da MT não foi alterada neste trabalho.

Sugere-se ainda, que trabalhos como este, avaliando a expressão da MT em epitélio de animais alcoolizados cronicamente, passem a ter outros parâmetros de avaliação, como por exemplo, a contagem do número de células de camadas do epitélio, bem como avaliar volume celular citoplasmático e nuclear, pois, sabidamente, estas alterações estão diretamente relacionadas com a ingestão do etanol (Maier et al., 1994; Seitz et al., 2001).

Ainda que o significado da expressão da MT em relação ao consumo de álcool não tenha sido definitivamente esclarecido, acredita-se que os resultados aqui apresentados possam contribuir para um melhor conhecimento sobre tal fato, ainda que encontrados resultados contrários à grande parte dos estudos. Visto que o consumo de soluções de etanol é considerado um agente promotor da carcinogênese bucal, e que a MT está envolvida na proteção anticarcinogênica em diversos tecidos, mas associa-se ao pior prognóstico para os pacientes portadores de neoplasias malignas com superexpressão desse antígeno, inclusive para o câncer de boca, acredita-se que os resultados aqui apresentados justifiquem a realização de estudos adicionais para esclarecer cada vez mais tal relacionamento.

7) CONCLUSÕES

- A alcoolização crônica, neste experimento, não promoveu alterações na espessura epitelial dos animais, tanto nos que foram submetidos à menor, quanto à maior concentração de etanol.
- A alcoolização crônica, não favoreceu também, o aumento da expressão de metalotioneína no epitélio lingual dos camundongos estudados.

8) REFERÊNCIAS

1. Al-Damouk JD (1993) Oral epithelial response to experimental chronic alcohol ingestion in hamsters. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol.** 76(6):736-41.
2. Barnard NA, Scully C, Eveson JW, Cunningham S, Porter SR (1993) Oral cancer development in patients with oral lichen planus. **J Oral Pathol Med** 22(9):421-424.
3. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni Jr JF (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res** 48:3282-87.
4. Boffetta P, Hashibe M (2006) Alcohol and cancer. **Lancet Oncol** 7:149-56.
5. Bours V, Bentires-ALJ M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, Benoit V, Merville MP (2000) Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis. **Biochem Pharmacol**. 60(8):1085-9.
6. Boyle P, Autier P, Bartelink H, Baselga J, Boffetta P, Burn J, Burns HJ, Christensen L, Denis L, Dicato M, Diehl V, Doll R, Franceschi S, Gillis CR, Gray N, Griciute L, Hackshaw A, Kasler M, Kogevinas M, Kvinnslund S, La Vecchia C, Levi F, McVie JG, Maisonneuve P, Martin-Moreno JM, Bishop JN, Oleari F, Perrin P, Quinn M, Richards M, Ringborg U, Scully C, Siracka E, Storm H, Tubiana M, Tursz T, Veronesi U, Wald N, Weber W, Zaridze DG, Zatonski W, zur Hausen H (2003) European code against cancer and scientific justification: third version. **Ann Oncol** 14(7):973-1005.
7. Bray I, Brennan P, Boffetta P (2000) Projections of alcohol- and tobacco related cancer mortality in Central Europe. **Int J Cancer** 87:122-8.
8. Camarini R, Hodge CW (2004) Ethanol preexposure increases ethanol self-administration in C57BL/6J and DBA/2J mice. **Pharmacology Biochem Behav** 79(4):623-32.
9. Canto MT, Devessa SS (2002) Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in United States, 1975 – 1998. **Oral Oncology**. 38:610-7.
10. Cardoso SV (2001) **Estudo da expressão imuno-histoquímica da MT em carcinoma epidermóide de boca.** Dissertação, mestrado. Belo Horizonte.
11. Chan J, Huang Z, Merrifield ME, Salgado MT, Stillman MJ (2002) Studies of metal binding reactions in metallothionein by spectroscopic, molecular biology and molecular modeling techniques. **Coord Chem Rev.** 233-4:319-39.
12. Cherian MG, Howell SB, Imura N, Klaassen CD, Koropatnick J, Lazo JS, Waalkes MP (1994) Role of metallothionein in carcinogenesis. **Toxicol. Appl. Pharmacol** 126:1-5.
13. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH (2003) Metallothioneins in human tumours and potential roles in carcinogenesis. **Mutat Res** 533(1-2):201-9.

14. Chorilli M, Michelin DC, Salgado HRN (2007) Animais de laboratório: o camundongo. **Rev Ciênc Farm Básica Apl** 28(1):11-23.
15. Corrao G, Bagnardi V, Zambon A, Torchio P (1998) Meta-analysis of alcohol intake in relation to risk of liver cirrhosis. **Alcohol Alcoholism** 33: 381–92.
16. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM (2002) Metallothionein: the multipurpose protein. **Cell Mol Life Sci.** 59(4):627-47.
17. Deng DX, Cai L, Chakrabarti S, Cherian MG (1999) Increased radiation-induced apoptosis in mouse thymus in the absence of metallothionein. **Toxicology** 134(1):39-49.
18. Deng DX, Ono S, Koropatnick J, Cherian MG (1998) Metallothionein and apoptosis in the toxic milk mutant mouse. **Lab Invest.** 78(2):175-83.
19. Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Müller-Richter U, Kosmehl H, Reichert TE (2007) Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. **J Dtsch Dermatol Ges.** 5(12):1095-100.
20. Elwood JM, Pearson JC, Skippen DH, Jackson SM (1984) Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. **Int J Cancer** 34(5):603-12.
21. Ferlay J, Pisani P, Parkin DM. (2004) GLOBOCAN 2002. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base (2002 estimates). **Lyon: IARC Press.**
22. Figueiro-Ruiz H, Peláez MAC, Lapiédra RC, Gómez E, López LAM (2004) Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. **Med Oral** 9:14-23.
23. Fischer EH, Davie EW (1998) Recent excitement regarding metallothionein. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 95(7):3333-4.
24. Flaitz CM, Nichols CM, Adler-Storthz K, Hicks MJ (1995) Intraoral squamous cell carcinoma in human immunodeficiency syndrome virus infection. A clinicopathologic study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 80(1):55-62.
25. Franceschi S, Talamini R, Barra S, Barón AE, Negri E, Bidoli E, Serraino D, La Vecchia C (1990) Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx and esophagus in northern Italy. **Cancer Research** 50:6502-6507.
26. Garrote LF, Herrero R, Reyes RM, Vaccarella S, Anta JL, Ferbeye L, Muñoz N, Franceschi S (2001) Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. **Br J Cancer** 85(1):46–54.
27. Gillison ML, Shah KV (2001) Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: Mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. **Curr Opin Oncol** 13:183-8.
28. Haq F, Mahoney M, Koropatnick J (2003) Signaling events for metallothionein induction. **Mutat Res.** 533(1-2):211-26.

29. Harris CK, Warnakulasuriya KAAS, Cooper DJ, Peters TJ, Gelbier S (2004) Prevalence of oral mucosal lesions in alcohol misusers in south London. **J Oral Pathol Med.** 33:253-9.
30. Homann H, Kärkkäinen P, Koivisto T, Nosova T, Jokelainen K, Salaspuro M (1997) Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. **Journal of the National Cancer Institute** 89:1692-7.
31. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM (2001) Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. **Oral Diseases** 7:349-54.
32. Hussain S, Slikker W JR, Ali SF (1996) Role of metallothionein and other antioxidants in scavenging superoxide radicals and their possible role in neuroprotection. **Neurochem Int.** 29(2):145-52.
33. Ide R, Mizoue T, Fujino Y, Hoshiyama Y, Sakata K, Tamakoshi A, Yoshimura T (2008) Cigarette smoking, alcohol drinking and oral and pharyngeal cancer mortality in Japan. **Oral Diseases** 14:314-9.
34. Izzotti A, Balansky RM, Blagoeva PM, Mircheva ZI, Tulimiero L, Cartiglia C, De Flora S (1998) DNA alterations in rat organs after chronic exposure to cigarette smoke and/or ethanol ingestion. **FASEB J.** 12:753-8.
35. Jasani B, Schmid KW (1997) Significance of metallothionein overexpression in human tumours. **Histopathology** 31:211-4.
36. Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, MacDonald DG, Bouquot JE, Slootweg PJ (2005) Squamous cell carcinoma. Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tomuours. **World Health Organization Classification of Tumours**:168-75.
37. Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS (1993) Epidemiology and aetiology of oral cancer in the United Kingdom. **Community Dental Health** 10:13-29.
38. Katsuragi H, Hasegawa A, Saito K (1997) Distribution of metallothionein in cigarette smokers and non-smokers in advanced periodontitis patients. **J Periodontol.** 68(10):1005-9.
39. Keil U, Liese A, Filipiak B, Swales JD, Grobbee DE (1998) Alcohol, blood pressure and hypertension. **Novartis Found Symp** 216: 125-44.
40. Kim CH, Kim, JH, Lee J, Ahn YS (2003) Zinc-induced NF-kappaB inhibition can be modulates by changes in the intracellular metallothionein level. **Toxicol Appl Pharmacol.** 190(2):189-96.
41. Kondo Y, Rusnak JM, Hoyt DG, Settinieri CE, Pitt BR, Lazo JS (1997) Enhanced apoptosis in metallothionein null cells. **Mol Pharmacol.** 52(2):195-201.
42. Kondo Y, Woo ES, Michalska AE, Choo KH, Lazo JS (1995) Metallothionein null cells have sensitivity to anticancer drugs. **Cancer Res.** 55(10):2021-3.

43. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G and Negri E (1997) **Epidemiology and Prevention of Oral Cancer.** *Oral Oncology* 33-5:302-12.
44. Lambert JC, Zhou Z, Wang L, Song Z, McClain CJ, Kang YJ (2004) Preservation of intestinal structural integrity by zinc is independent of metallothionein in alcohol-intoxicated mice. *Am. J. Pathol.* 164(6):1959-66.
45. Lazo JS, Kuo SM, Woo ES, Pitt BR (1998) The protein tjiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs. *Chem Biol Interact* 24(111-112):255-62.
46. Leite CM, Botelho AS, Oliveira JR, Cardoso SV, Loyola AM, Gomez RS, Vaz RR (2004) Immunolocalization of HLA-DR and metallothionein on amalgam tattoos. *Braz Dent J.* 15(2):99-103.
47. Levadoux-Martin M, Hesketh JE, Beattie JH, Wallace HM (2001) Influence of metallothionein-1 localization on its function. *Biochem J.* 15(355)Pt2:473-9.
48. Loney KD, Uddin KR, Singh SM (2003) Strain-specific brain metallothionein II (MT-II) gene expression, its ethanol responsiveness, and association with ethanol preference in mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 27(3):388-95.
49. Maier H, Weidauer H, Zöller J, Seitz HK, Flentje M, Mall G, Born IA (1994) Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res* 18(2):387-91.
50. Maito FLDM, Rados PV, Filho MS, Barbachan JJ, Quadros O (2003) Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of, or topical exposure to, alcohol. *Alcohol* 31:25-30.
51. Mascres C, Ming-Wen F, Joly JG (1984) Morphologic changes of the oesophageal mucosa in the rat after chronic alcohol ingestion. *Experimental Pathology* 25:147-53.
52. Mckim JMJR, Choudhuri S, Klaassen CD (1992) In vitro degradation of apo-zinc and cadmium-metallothionein by cathepsins B, C and D. *Toxicol Appl Pharmacol.* 116(1):117-24.
53. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V (2000) Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 35(1):35-70.
54. Miller CS, White DK (1996) Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma. A retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 82:57-68.
55. Mognetti B, Di Carlo F, Berta GN (2006) Animals models in oral cancer research. *Oral Oncology.* 42:448-60.
56. Muller P, Hepke B, Meldau U, Raabe G (1983) Tissue damage in the rabbit oral mucosa by acute and chronic direct action of different alcohol concentrations. *Experimental Pathology* 24:171-81.

57. Murti PR, Bhonsle RB, Gupta PC, Daftary DK, Pindborg JJ, Mehta FS (1995) Etiology of oral submucous fibrosis with special reference to the role of areca nut chewing. **J Oral Pathol Med.** 24(4):145-152.
58. Muwonge R, Ramadas K, Sankila R, Thara S, Thomas G, Vinoda J, Sankaranarayanan R (2008) Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: A nested case-control design using incident cancer cases. **Oral Oncology** 44:446-54.
59. Nagel WW, Vallee BL (1995) Cell cycle regulation of metallothionein in human colonic cancer cells. **Proc Acad Sci U S A.** 92(2):579-83.
60. Navasumrit P, Margison GP, O'Connor PJ (2001) Ethanol modulates rat hepatic DNA repair functions. **Alcohol Alcohol** 36(5):369-76.
61. Neves MN, Borges DR, Vilela MP (1989) Ethanol concentration in alcoholic liquors with the highest consumption in Brazil. **GED** 8(1) jan-mar.
62. Neville BW and Day TA (2002) Oral Cancer and Precancerous Lesions. **CA Cancer J Clin.** 52:195-215.
63. Nordman R (1994) Alcohol and antioxidant system. **Alc Alc.** 29:818-9.
64. Ogden GR (2005) Alcohol and cancer. **Alcohol** 35(3):169-73.
65. Ogden GR, Wight AJ (1998) Aetiology of oral cancer: alcohol. **Br J Oral Maxillofac Surg.** 36(4):247-51.
66. Palmiter RD (1998) The elusive function of metallothionein. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 95: 8428-30.
67. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J (1999) Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. **International Journal of cancer** 80:827-41.
68. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB (2003) Cancer Incidence in Five Continents, Vol. VIII. **IARC.**
69. Parlesak A, Pohl C, Bode JC, Bode C (2004) Water metabolism in rats subjected to chronic alcohol administration. **Nephron Physiol** 97(1):9-15.
70. Pitt BR, Schwarz M, Woo ES, Yee E, Wasserloos K, Tran S, Weng W, Mannix RJ, Watkins SA, Tyurina YY, Tyurin VA, Kagan VE, Lazo JS (1997) Overexpression of metallothionein decreases sensitivity of pulmonary endothelial cells to oxidant injury. **Am J Physiol.** 273:856-65.
71. Pöschl G, Seitz H (2004) Alcohol and cancer. **Alcohol and Alcoholism** 39(3):155-65.
72. Quesada AR, Burnes RW, Krezski SO, Petering DH (1996) Direct reaction of H₂O₂ with sulphhydryl groups in HL-60 cells: zinc-metallotionein and other sites. **Arch Biochem Biophys.** 334(2):241-50.

73. Rehm J, Room R, Monteiro M (2004) Alcohol use. In: Ezzati M, Murray C, Lopez AD, Rodgers A (eds). Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease attributable to selected major risk factors. Geneva: **World Health Organization** 959–1108.
74. Romero-Isart N, Vasak M (2002) Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. **J Inorg Biochem** 88(3-4):388-96.
75. Rothman KJ (1980) The proportion of the cancer attributable to alcohol consumption. **Preventive Medicine**. 9:174-9.
76. Saber R, Piskin E (2003) Investigation of complexation of immobilized metallothionein with Zn(II) and Cd(II) ions piezoelectric crystals. **Biosens Bioelectron**. 18(8):1039-46.
77. Satoh M (2004) Toxicological significance of metallothionein on environmental harmful factors: verification and suggestions from metallothionein-I-II null mouse model study. **Nippon Eiseigaku Zasshi**. 59(3):317-25.
78. Seitz HK, Matsuzaki S, Yokoyama A, Homann N, Väkeväinen S, Wang XD (2001) Alcohol and cancer. **Alcohol Clin Exp Res**. 25(5 Suppl ISBRA):137S-43S.
79. Shibuski CH, Shibuski SC, Silverman S Jr. (2000) Trends in oral cancer rates in United States, 1973-1996. **Community Dent Oral Epidemiol**. 28:249-56.
80. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada-Nur F, Giannotti K (1991) A prospective study of findings and management in 214 patients with oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 72(6):665-70.
81. Simpkins CO (2000) Metallothionein in human disease. **Cell Mol Biol** (Noisy-le-grand) 46(2):465-88.
82. Slootweg PJ; Eveson JW (2005) **Tumors of the oral cavity and oropharynx**: Introduction. Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours:166-7.
83. Soffritti M, Belpoggi F, Lambertin L, Lauriola M, Padovani M, Maltoni C. (2002) Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of formaldehyde and acetaldehyde in rats. **Ann N Y Acad Sci**. 982:87-105.
84. Spanagel R (2003) Alcohol addiction research: from animal models to clinics. **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 17(4):507-18.
85. Spanagel R (2005) Recent animal models of alcoholism. **Alcohol Res Health** 24(2):124-31.
86. Squier CA (1991) The permeability of oral mucosa. **Crit Rev Oral Biol Med** 2(1):13-32.
87. Steinebach OM, Wolterbeek BT (1992) Metallothionein biodegradation in rat hepatoma cells: a compartmental analysis aided ³⁵S-radiotracer study. **Biochim Biophys Acta**. 1116(2):155-65.

88. Suhy DA, Simon KD, Linzer DI, O'halloran TV (1999) Metallothionein is part of zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. **J Biol Chem.** 274(14):9183-92.
89. Szelachowska J, Dziegiej P, Jelen-Krzeszewska J, Jelen M, Tarkowski R, Spytkowska B, Matkowski R, Kornafel J (2009) Correlation of metallothionein expression with clinical progression of cancer in the oral cavity. **Anticancer Res** 29(2):589-95.
90. Takano H, Satoh M, Shimada A, Sagai M, Yoshikawa T, Tohyama C (2000) Cytoprotection by metallothionein against gastroduodenal mucosal injury caused by ethanol in mice. **Lab Invest** 80:3371-7.
91. Talamini R, Franceschi S, Barra S, La Vecchia C (1990) The role of alcohol in oral and pharyngeal cancer in nonsmokers, and of tobacco in nondrinkers. **International Journal of Cancer** 46:391-3.
92. Tapiero H, Tew KD (2003) Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. **Biomed Pharmacother** 57(9):399-411.
93. Thakker KD (1998) An overview of health risks and benefits of alcohol consumption. **Alcoholism Clin Exper Res** 22:S285-98.
94. Theocharis S E, Margeli A P, Klijanienko J T & Kouraklis G P (2004) Metallothionein expression in human neoplasia. **Histopathology** 45:103-18.
95. Theocharis S, Margeli A, Koutselinis A (2003) Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer. **Int. J. Biol. Markers** 18:162-9.
96. Tomita K, Azuma T, Kitamura N, Tamiya G, Ando S, Nagata H, Kato S, Inokuchi S, Nishimura T, Ishii H, Hibi I (2004) Leptin deficiency enhances sensitivity of rats to alcoholic steatohepatitis through suppression of metallothionein. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 287(5):1078-85.
97. Trayhurn P, Beattie JH (2001) Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. **Proc Nutr Soc.** 60:329-39.
98. Valentine JA, Scott J, West C, Hill A (1985) A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. **J. Oral Pathol.** 14(8):654-65.
99. Vallee BL, Coleman JE, Auld DS (1991) Zinc fingers, zinc clusters and zinc twists in DNA-binding protein domains. **Proc Natl Acad U S A.** 88:999-1003.
100. Visapaa JP, Gotte K, Benesova M, Li J, Homann N, Conradt C, Inoue H, Tisch M, Horrmann K, Vakevainen S, Salaspuro M, Seitz HK (2004) Increased cancer risk in heavy drinkers with the alcohol dehydrogenase 1C 1 allele possibly due to salivary acetaldehyde. **Gut.** 53(6):871-6.
101. Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology** 192:95-117.

102. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2008, doi: 10.1016/ **J.Oraloncology**.2008.06.002.
103. Wight AJ, Orden GR (1998) Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer: a review. **Oral Oncology** 34:441-7.
104. Winn DM, Ziegler RG, Pickle LW, Gridley G, Blot WJ, Hoover RN (1984) Diet in the etiology of oral and pharyngeal cancer among women from the southern **United States**. **Cancer Res** 44(3):1216-22.
105. Woo ES, Kondo Y, Watkins SC, Hoyt DG, Lazo JS (1996) Nucleophilic distribution of metallothionein in human tumor cells. **Exp Cell Res**. 224:365-71.
106. Wünsch-Filho V (2002) The Epidemiology of Oral and Pharynx Cancer in Brazil. **Oral Oncology** 38:737-46.
107. Wünsch-Filho V, Camargo A (2001) The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: epidemiologic issues. **Seminars Oncol**. 28:158–68.
108. Yoneyama N, Crabbe JC, Ford MM, Murillo A, Finn DA (2008) Voluntary ethanol consumption in 22 inbred mouse strains. **Alcohol** 42(3):149-60.
109. Zhou Z, Sun X, Kang YJ (2002) Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stress. **Exp Biol Med** 227(3):214-2.