

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Avaliação da expressão imuno-histoquímica Metalotioneína, p53 e PCNA em
alcoolização crônica experimental em camundongos

Thaissa Lopes de Melo

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho – 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Avaliação da expressão imuno-histoquímica da Metalotioneína, p53 e PCNA em
alcoólização crônica experimental em camundongos

Thaissa Lopes de Melo

Adriano Mota Loyola

Monografia apresentada à coordenação do
Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia, para a
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Uberlândia – MG
Julho – 2005

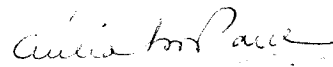
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Avaliação da expressão imuno-histoquímica Metalotioneína, p53 e PCNA em
alcoolização crônica experimental em camundongos

Thaissa Lopes de Melo

Adriano Mota Loyola
FOUFU

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em 07/04/05.



Uberlândia – MG
Julho – 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS


Avaliação da expressão imuno-histoquímica Metalotioneína, p53 e PCNA em
alcoolização crônica experimental em camundongos

Thaissa Lopes de Melo

Aprovada pela Banca Examinadora em: 13 / 07 / 2005 Nota: 10

Adriano Mota Loyola

Elisângela Maria Cunha Costa



Paulo Rogério de Faria

Uberlândia, 13 de julho de 2005.

Avaliação da expressão imuno-histoquímica Metalotioneína, p53 e PCNA em alcoolização crônica experimental em camundongos

THAISSA LOPES DE MELO¹

ADRIANO MOTA LOYOLA²

RESUMO

Sabe-se que os compostos oriundos do metabolismo do álcool são importantes fatores de estresse oxidativo intracelular. No tecido epitelial de cavidade oral, o álcool metabolizado pelos queratinócitos em acetaldeído e radical hidroxila, duas moléculas indutoras de estresse oxidativo e de alterações celulares e teciduais importantes, culminando, em última caso, com o aparecimento do carcinoma epidermóide. Segundo estudo realizado por Costa (2005), tem-se que a administração crônica do álcool favorece o aumento da espessura do epitélio lingual de camundongos e aumento da expressão da proteína metalotioneína (MT), uma importante molécula citoprotetora intracelular. Contudo, vários estudos têm mostrado que a MT parece apresentar um efeito antagônico em algumas circunstâncias ainda pouco esclarecidas, mas importante no processo de carcinogênese, que é a indução da proliferação celular e inibição da apoptose. Assim, o presente trabalho teve por objetivo analisar a expressão imuno-histoquímica das proteínas MT (clone E9) e de p53 (clone CM5) e PCNA (policlonal) em animais submetidos à alcoolização crônica, e também avaliar a espessura do tecido epitelial. Para realização dos experimentos, utilizamos camundongos C57BL/6 geneticamente selecionados para alta ingestão de álcool. Os animais foram divididos em três grupos, a saber: (1) grupo controle, (2) um grupo experimental bebendo solução alcoólica na concentração de 15% e (3) um outro grupo experimental bebendo solução alcoólica na concentração de 30%. Para detecção das proteínas teciduais MT, P53 e PCNA, usou-se a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Para avaliação da expressão das três proteínas utilizou-se a técnica da contagem como descrito por Costa (2005). Para avaliação da espessura epitelial, utilizou-se a “técnica da reta” de acordo com o protocolo estabelecido por Costa (2005). A análise estatística foi realizada através da obtenção de dados descritivos, como a média e desvio padrão. Os testes utilizados foram os testes paramétricos ANOVA (Teste F) e de Tukey. Observamos um aumento na espessura do tecido epitelial principalmente no grupo experimental que recebeu 15% e 30% de solução alcoólica, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Além disso, encontramos um aumento na expressão de PCNA nos grupos alcoolizados quando comparado ao grupo controle indicando que a alcoolização

aumenta o índice de proliferação celular. A p53 teve uma queda em sua expressão apenas nos grupo experimental de 15%. Já a MT demonstrou um leve aumento de sua expressão nos dois grupos experimentais alcoolizados, sem, no entanto, que este aumento fosse estatisticamente significativo.

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que o uso crônico do álcool promove um aumento da expressão da MT, redução da expressão de p53 na dose de 15% e aumento da expressão de PCNA. Além de proporcionar um aumento na espessura do epitélio lingual.

PALAVRAS-CHAVE: Experimentação animal. Alcoolização. Carcinoma epidermóide. Metalotioneína. p53. PCNA.

1- Bolsista PIBIC/UFU, FOUFU – UFU, Av. Pará, 1720, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
2- Professor Adjunto, FOUFU – UFU, e-mail: adrianol@hc.ufu.br

INTRODUÇÃO

Dentre as várias neoplasias que acometem a cavidade oral o carcinoma epidermóide é a neoplasia maligna mais comum (Neville & Day. 2002; Faria et al. 2003). Esse tumor, derivado de células epiteliais, apresenta um padrão histológico semelhante ao epitélio de revestimento da mucosa e da pele. A sua patogênese compreende a concorrência de fatores intrínsecos (deficiência nutricional e anemia ferropriva) e extrínsecos, dos quais o fumo e o álcool são os intimamente relacionados, com riscos diretamente proporcionais ao tempo de uso e às quantidades ingeridas. Atuando em conjunto aumentam o risco do desenvolvimento da doença (Maier et al. 1994; Pöschl & Seitz. 2004).

Alguns autores consideram o efeito individual do álcool como facilitador do aparecimento do carcinoma epidermóide (Hindle et al. 2000; Figuero Ruiz et al. 2004). Sabe-se que o etanol não é uma substância carcinogênica (Figueiro Ruiz et al. 2004). Porém ele é enquadrado como um fator de risco, dado que ele aumenta a permeabilidade da membrana bucal, permitindo a penetração de substâncias carcinogênicas, além do que seus metabólitos (acetaldeído e hidroxila) são

diretamente carcinogênicos para os animais (Wight; Ogden. 1998).

O álcool, além de ser metabolizado pelo fígado, também conta com um metabolismo extra-hepático, em menor quantidade, nas mucosas gástrica, duodenal e bucal (Wight & Ogden. 1998). Nestas mucosas a metabolização do álcool é feita pela enzima álcool desidrogenase, que leva a um acúmulo de acetaldeído e liberação de radicais livres, tais como superóxido, hidroxila e peróxido, altamente prejudiciais aos tecidos e às células (Rukkumani et al. 2004). O acetaldeído é tóxico, mutagênico e carcinogênico, interferindo na síntese e reparo do DNA, o que possibilita o aparecimento de tumor (Helander & Lindahl-Kiessling, 1991).

Diversos tipos de estresse celular, como o causado por radicais livres, têm sido associados à indução da expressão de uma proteína intracelular denominada Metalotioneína (MT). Esta proteína de baixo peso molecular (60 a 70 KDa) tem acentuada capacidade de ligar-se a compostos ionizados, com grande afinidade por metais de transição, e também à radicais livres (Romero-Isart & Vasak. 2002). Assim sendo, a MT tem função citoprotetora contra diversos tipos de agressão (Cherian et al. 2003). Contudo, alguns pesquisadores, como

Douglas-Jones et al (1997) e Bruewer et al. (2002), relataram que a superexpressão da MT está relacionada a eventos que favorecem a carcinogênese, como o aumento da proliferação celular e inibição da apoptose.

Os diferentes tipos e isoformas da MT em mamíferos são constituídos por cerca de 60 aminoácidos, em que um terço destes são resíduos de cisteína. (Miles et al. 2000; Romero-Isart & Vasak. 2002; Cherian et al. 2003). Em condições teciduais normais, a MT liga-se primeiramente ao zinco e secundariamente ao cobre, considerados essenciais ao funcionamento celular (Saber & Piskin. 2003). Tem sido considerada como a principal proteína relacionada à regulação da biodisponibilidade do zinco no ambiente intracelular (Suhy et al. 1999). Este metal possui propriedades antioxidantes e participa da regulação da apoptose, da inflamação e do funcionamento do sistema nervoso central (Tapiero & Tew. 2003). Apresenta função catalítica ou estrutural, e sua presença é essencial para a atividade de vários de fatores de transcrição gênica como, por exemplo, a proteína p53, a qual é essencial na manutenção da integridade genômica e, portanto, da supressão tumoral

(Palmiter, 1998; Suhy et al. 1999; Simpkins, 2000).

A proteína p53 é responsável pela ativação da transcrição de genes associados à paralisação do ciclo celular, ao reparo do DNA e à indução de apoptose (Vousden, 2002). Para atuar como fator de transcrição, a p53 precisa se ligar ao DNA, e esta ligação é dependente de zinco. Assim, como demonstrado por Méplan et al. (2000), a MT é capaz de modular a conformação, a ligação ao DNA e a atividade transcricional da p53, mediante a doação e remoção do zinco, que garante a estrutura funcional desta proteína.

Quando um dano no DNA não é corrigido a p53 funcional ativa a maquinaria de morte celular programada, ou apoptose. Este processo pode ocorrer pela ativação de uma série de eventos intracelulares, programados e coordenados geneticamente (Kerr et al. 1994), em que as células sofrem autodestruição sem causar dano às células vizinhas, nem desencadear uma resposta inflamatória. A morte celular apoptótica permite a eliminação de células presentes em excesso, que apresentam desenvolvimento inadequado ou que possuam erros genéticos (Vauz & Flavell. 2000). Quando ocorre algum problema na indução da apoptose, como a presença de p53 não funcional ou a sua ausência, o ciclo celular progride sem o

reparo do DNA promovendo a inserção definitiva da mutação à molécula de DNA. O p53 não funcional ou a sua ausência pode estar relacionado com a alcoolização, como mostrado por Ahrendt et al. (2000). Em seu trabalho com câncer pulmonar, os autores mostraram que o álcool age aumentando a frequência de mutações no gene da proteína p53.

O estudo desenvolvido por Costa (2005) demonstrou que a alcoolização leva a um aumento na expressão da MT no epitélio lingual de camundongos, e também favorece o aumento da espessura epitelial, mas, aparentemente, sem um aumento significativo das camadas celulares de tal tecido. O aumento da espessura epitelial pode ser devido ao aumento na taxa de proliferação celular, por inibição da apoptose, ou por associação desses dois fatores.

Diante do exposto, este trabalho se propôs a avaliar a proliferação celular, através da avaliação imuno-histoquímica da PCNA, bem como analisar a expressão das proteínas p53 e MT em animais submetidos à alcoolização crônica. Também objetivamos com este trabalho avaliar a espessura do tecido epitelial de língua de camundongos alcoolizados comparado a de não alcoolizados.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização do trabalho foram utilizados 19 camundongos machos C57BL/6 (CEMIB-UNICAMP, Campinas, São Paulo), geneticamente selecionados para alta ingestão de álcool, com idade de 12 semanas e média de peso de 28,5g (variando entre 23,5 e 33g). Os animais foram alojados em gaiolas, mantidos em ambiente com temperatura controlada a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$, respeitando-se o ciclo claro-escuro de 12 horas, com fornecimento de ração e água *ad libitum*.

Para a fase de adaptação da ingestão alcoólica utilizou-se solução etanólica adicionada de sacarose, nas concentrações de 2%, 4%, 6%, 8%, 10% e 15% durante uma semana para cada concentração, mantendo-se a oferta de água e ração *ad libitum*. Ao elevar-se a concentração de etanol a 15%, a sacarose foi retirada. Esse protocolo foi desenvolvido para 14 animais, sendo outros cinco mantidos somente com água e ração *ad libitum* (grupo controle).

Ao atingir-se a concentração a 15% da solução etanólica os animais foram divididos, aleatoriamente, em dois grupos (N= 7). No primeiro, os animais foram tratados com solução etanólica a 15%. O segundo grupo foi adaptado para receber

solução etanólica na concentração de 30%, sendo esta adaptação realizada em concentrações crescentes de 5% a cada semana até atingir a concentração desejada. As concentrações de 15% e 30% foram mantidas durante seis meses para desenvolvimento dos padrões de dependência alcoólica (Costa, 2005).

Após seis meses de ingestão, os animais foram mortos pelo método de deslocamento cervical (Am. Vet. Méd. Assoc, 2001). As línguas foram seccionadas na sua base e fixadas em paraformoldeído 4% tamponado com PBS (pH 7,2). Posteriormente, as línguas foram seccionadas em três fragmentos, anterior, médio e posterior.

Após o período de fixação, os fragmentos foram submetidos à desidratação, diafanização e colocados em parafina. Os blocos foram cortados em 5 µm de espessura e colhidos em lâminas, que foram coradas com Hematoxilina de Harris por 2 minutos, lavadas em água corrente e em álcool 80%. Foram colocadas em solução de eosina por 30 segundos e lavadas em álcool 80%, 90% em álcool absoluto, xilol por 2 vezes e montados com Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Após o processamento do material, para as evidências imuno-histoquímicas,

empregou-se o método avidina-biotina-peroxidase como previamente descrito por Hsu et al. (1981), modificado de acordo com as condições do laboratório.

Inicialmente, foram obtidos cortes histológicos de 3µm de espessura, montados em lâminas de vidro previamente recobertas com organossilano (3-aminopropyltriethoxysilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Os cortes foram submersos em 500ml de solução tampão de EDTA (EthyleneDiamine Tetraacetic Acid; NUCLEAR), 1mM, pH 8,0, e submetidos a ambiente de microondas para recuperação dos epitopos antigênicos pesquisados. Em seguida, os cortes foram lavados e colocados em cubas de Couplin, onde receberam quatro banhos de cinco minutos cada em H₂O₂ (10V), para bloqueio da atividade da peroxidase endógena. As lâminas foram colocadas em tampão fosfato-salina (PSB) 0,01 M, pH 7,4 por cinco minutos. Na sequência, os cortes foram incubados com solução de avidina, e lavados em PBS. Os cortes histológicos serão incubados com solução de biotina (DAKO Co, Carpinteria, USA). A utilização destas soluções (Miller et al., 1999) ricas em avidina e biotina são importantes para neutralizar as biotinas endógenas, que dificultam a discriminação satisfatória da imunomarcagem.

Após as etapas de bloqueio, procedeu-se a incubação com os anticorpos primários anti-MT (Clones E9, DAKO Cyto, Carpinteria, USA), anti-p53 (Clone CM5, NOVOCASTRA, USA) e anti-PCNA (Policlonal, DAKO Cyto, Carpinteria, USA), titulados a 1:320 em tampão fosfato (PBS), com BSA (contendo azida sódica a 0,1%, pH 7,4) realizadas em câmara úmida. Foram adicionados soro albumina bovina (BSA) a 1% e azida sódica a 0,1% para evitar ligações inespecíficas dos anticorpos primários. Os cortes histológicos foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário bionilado (Dako, Carpinteria, CA, USA). Após esse procedimento, os cortes passaram por três banhos em PBS e sua incubação foi com complexo streptavidina-biotina-peroxidase (SABC, DAKO Co, Carpinteria, CA, USA. 1:300).

A revelação da reação foi desenvolvida a partir de solução cromógena contendo 0,08 g de diaminobenzidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluída em 100 ml de tampão TRIS-HCl, pH 7,4, passada em filtro duplo e adicionando-se 1,3 ml de peróxido de hidrogênio. Os cortes foram então contra-corados pela hematoxilina de Harris, por três minutos, diafanizados em três banhos de xilol, sendo

as lâminas montadas com Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Para controle positivo dos ensaios, foram utilizadas amostras teciduais de carcinoma ductal de mama conhecidamente reativas para MT e p53, e para o PCNA amostras de amígdala humana. A ausência de marcação mediante a exclusão do anticorpo primário nos ensaios foi considerada como controle negativo.

Para análise do epitélio, capturou-se imagens com objetiva de aumento de 40 vezes (sistema KS300, Zeiss, Alemanha, aumento final de 1.600 vezes); transferiu-se tais imagens para o programa ImageJ, para realização da mensuração da espessura total do epitélio em micrômetros. Esta espessura foi considerada como intervalo (espaço) entre a superfície da camada queratinizada até a camada basal na interface com a lâmina própria. A orientação para esta mensuração foi determinada pelo longo eixo do núcleo da célula que se encontra na camada basal. Este método foi nomeado como “técnica da reta”, e foi realizado em todos os campos histológicos possíveis da borda lateral e ventre lingual.

Para a determinação do número mínimo de medidas da amostra, foi escolhida uma lâmina de cada grupo, sendo coletadas cinco medidas uniformes em cada

campo, traçando-se uma reta a partir do maior eixo da célula mais basal do epitélio até a camada queratinizada, contando assim o número de células marcadas e de células totais que tal reta cortava, este método é chamado de “técnica de contagem”. A avaliação do coeficiente de variância, foi obtido pela análise de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 campos sorteados aleatoriamente, para se obter uma média representativa de amostras que foram avaliadas (Costa, 2005). Assim, determinou-se que seria traçada uma reta em cada campo histológico, chegando a um total de 35 medidas por lâmina para MT e 30 medidas por lâmina para p53 e PCNA.

A “técnica de contagem” foi realizada para a avaliação da expressão de MT, p53 e PCNA. Obteve-se o número de células imuno-marcadas e o número de células totais pertencentes à reta, e o quociente desse resultado foi entendido como índice de marcação dos casos avaliados.

A análise estatística foi realizada através de métodos descritivos e pelos testes F (ANOVA) e Tukey. A utilização de uma abordagem paramétrica se dá pelo fato das suposições básicas deste tipo de abordagem não serem violadas (Zar, 1999). Ou seja, os dados podem ser considerados

independentes, normais e homocedásticos (variância constante).

RESULTADOS

A quantidade de solução alcoólica ingerida por dia (em ml) pelos grupos de 15 e 30% foi monitorada, obtendo-se uma média de 5,44ml, com variação de 5,22 a 5,72ml, do grupo 15% e média de 5,36ml, com variação de 4,94 a 5,82ml, para o de 30%. Tais dados mostram que não houve diferença significativa entre as quantidades de solução ingeridas pelos dois grupos, o que assegura um percentual diferencial de ingestão alcoólica para cada grupo.

Na mensuração do epitélio (em μm), pela “técnica da reta”, assim como relatado por Costa (2005), constatou-se diferença significativa entre o grupo de animais controle e os alcoolizados à 30% (Graf. 2)

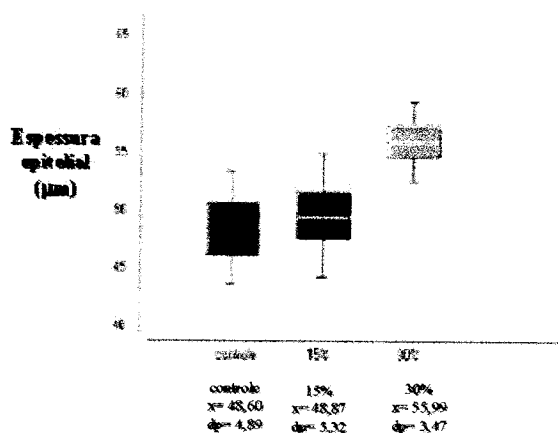


GRÁFICO 1: Diagrama de caixas e suíças representando os resultados das mensurações de espessura total do epitélio lingual obtidos pela “técnica da reta”. A barra central representa a média; a caixa, o erro padrão e as suíças, o desvio padrão da média. Os valores da média e desvio padrão estão impressos no eixo x do gráfico. * Diferença estatisticamente significativa, com $p = 0,02$ (teste de ANOVA).

Quanto à expressão da imuno marcação da MT, tal expressão foi aparentemente mais intensa nos grupos alcoolizados do que no grupo controle. Na “técnica de contagem” para MT (fig. 1), evidenciamos um aumento do número de camadas no grupo alcoolizado, mas tal aumento não foi significativo estatisticamente (graf. 2).

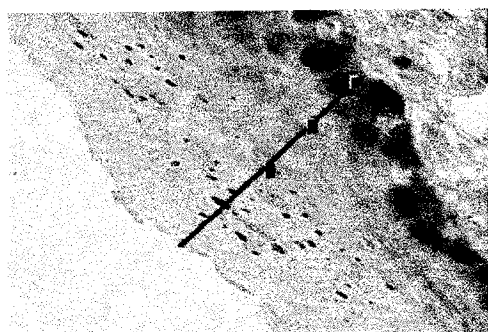


FIGURA 1. Segmento de mucosa lingual de camundongos C57BL/6 imunomarcada para MT. Observa-se na figura a representação gráfica que exemplifica o procedimento empregado na “técnica de contagem”. Sob a reta traçada há três quadrados na cor vermelha, representando o número total de células. O quadrado com contorno de cor amarela, representando a célula imunomarcada (Streptavidina-biotina-peroxidase). Magnificação: 400X

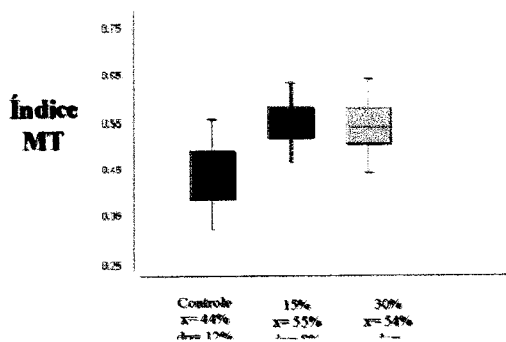


GRÁFICO 2: Diagrama de caixas e suíças representando os resultados dos índices de marcação imunistoquímica do antígeno para MT no epitélio lingual, obtidos pela “técnica de contagem”. Não houve diferença significativa entre os valores tabulados ($p = 0,1527$, teste de ANOVA).

Quanto à expressão da p53 (fig. 2), aparentemente, o grupo de alcoolização à 15% foi a que apresentou menor intensidade de marcação, tanto em relação ao grupo controle quanto em relação ao grupo de 30% (Graf. 3). Estatisticamente tal diferença foi comprovada, o grupo de 15% teve expressão menor do que do grupo controle e o de 30%, porém não houve diferença significativa entre os grupos controle e de 30%.

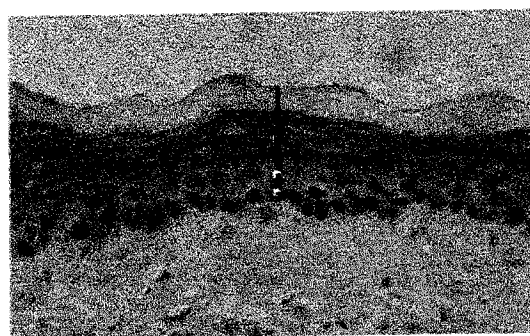


FIGURA 2. Segmento de mucosa lingual de camundongos C57BL/6 imunomarcada para p53. Pela “técnica de contagem”, observou-se sob a reta traçada o número de células totais e de células imunomarcadas (Streptavidina-biotina-peroxidase). Magnificação: 400X

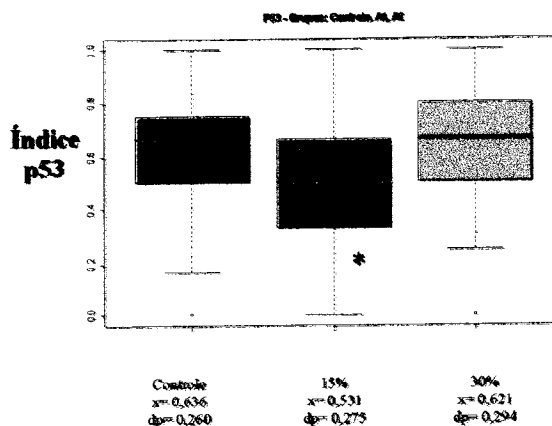


GRÁFICO 3. Diagrama de caixas e suíças representando os resultados das mensurações de espessura total do epitélio lingual obtidos pela “técnica de contagem” para p53. * Diferença estatisticamente significativa, com $p = 0,0003413$ (teste de ANOVA).

Com relação à expressão da PCNA (fig. 3), numa análise descritiva, o grupo controle se mostrou diferente em relação aos outros dois grupos (Graf. 3). Na análise estatística pode-se confirmar tal diferença. O grupo controle mostrou-se estatisticamente diferente dos outros dois grupos, apresentando uma expressão menor desta proteína. Porém, os dois grupos alcoolizados não tiveram diferença significativa entre si.

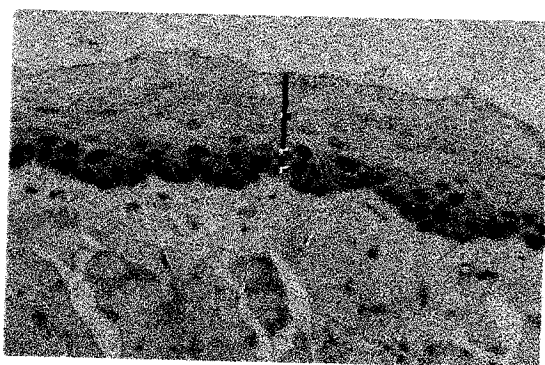


FIGURA 3. Segmento de mucosa lingual de camundongos C57BL/6 imunomarcada para PCNA. Também pela "técnica de contagem", observou-se sob a reta traçada o número de células totais e de células imunomarcadas (Streptavidina-biotina-peroxidase). Magnificação: 400X

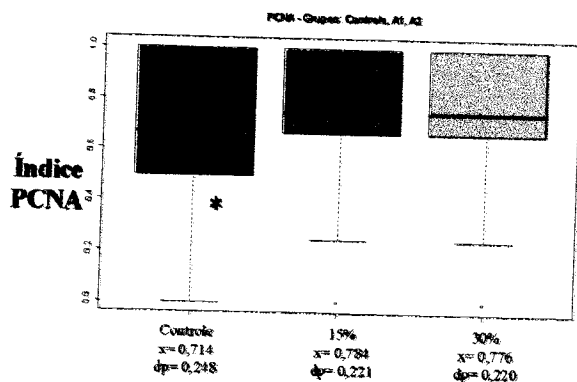


GRÁFICO 4. Diagrama de caixas e suíças representando os resultados das mensurações de espessura total do epitélio lingual obtidos pela "técnica de contagem" para PCNA. * Diferença estatisticamente significativa, com $p = 0.008702$ (teste de ANOVA).

DISCUSSÃO

Sabe-se que na metabolização extra-hepática do álcool tem a atuação da enzima álcool desidrogenase e que desta metabolização resulta o acetaldeído e radicais livres (Wight & Ogden, 1998). Esse estresse oxidativo pode levar à indução da expressão da proteína MT, que será importante para a proteção celular (Cherian et al. 2003).

Assim sendo, como era esperado, encontramos um aumento na expressão da MT com nos animais submetidos a alcoolização de 15% e 30% em relação ao grupo controle. Constatamos que tal aumento apesar de ter sido importante, não foi estatisticamente significativo.

Sendo a MT responsável pela biodisponibilidade de zinco no ambiente intracelular (Suhy et al. 1999), sua expressão influencia a expressão de outras proteínas que dependem do zinco para sua atuação. Vários autores tentaram estabelecer certa relação entre a expressão de MT e de p53. No entanto, tal relação se mostra controversa na literatura, em que alguns autores encontraram relação positiva entre tais proteínas (Ioachim et al. 2000) e outros uma relação inversa (Bruewer et al. 2002).

Sabe-se que a detecção da p53 por imuno-histoquímica, quando em condições normais, praticamente não é evidenciada, dado que a sua meia-vida é bastante curta. Segundo Moll et al. (1996) e Ottaggio et al. (2000), a detecção da p53 deve-se à sua precipitação, que ocorre pela formação de heterotetrâmeros de p53 normal e p53 que se encontra deficiente de zinco. Partridge et al. (1999) descreveram que o estresse genotóxico inibe a ligação de mdm2 à p53, e, visto que o mdm2 ao se ligar a esta proteína inibe sua ação, quando essa ligação não ocorre, há considerável acúmulo de p53 normal e ativa, possibilitando a sua detecção tecidual pela técnica de imuno-histoquímica.

Sabendo disso, é de se esperar que, ocorrendo uma maior citoproteção pela maior expressão de MT em grupos alcoolizados, o zinco se tornaria mais biodisponível à proteína p53, tornando-a funcional e difícil de ser detectada no tecido pela técnica de imuno-histoquímica.

Em nosso estudo encontramos a expressão da p53 diminuída no grupo alcoolizado à 15%, porém tal redução não foi encontrada no grupo de 30%. Esse resultado não vai de encontro com os achados da literatura. Contudo, vários fatores podem estar concorrendo para isso, como, por exemplo, diferenças

metodológicas de contagem empregadas nos estudos, problemas inerentes à técnica de imuno-histoquímica.

Alguns autores relatam que a superexpressão da MT está relacionada a eventos que favorecem a carcinogênese, como o aumento da proliferação celular e inibição da apoptose (Douglas-Jones et al. 1997; Bruewer et al. 2000). Nos achados de Costa (2005), bem como nos nossos, a espessura do epitélio lingual dos camundongos alcoolizados cronicamente aumentou, sobretudo, no grupo de 30%. Pode-se pensar que tal aumento se deu pelo aumento na proliferação celular, apesar de Costa (2005) constatar que não houve correlação entre a espessura epitelial e o número de camadas celulares em tal tecido.

Sabendo que o aumento na expressão da MT, quando favorece a carcinogênese, coincide com o aumento da proliferação celular, era de se esperar que nos grupos alcoolizados ocorresse maior proliferação celular, o que foi constatado em nosso estudo. A expressão da proteína PCNA, um importante marcador de proliferação celular, aumentou nos grupos alcoolizados.

Não podemos afirmar que o aumento da proliferação celular seja responsável pelo aumento na espessura epitelial, até porque o aumento significativo na espessura ocorreu

no grupo de 30% enquanto que a proliferação celular, através da expressão de PCNA, aumentou nos grupos alcoolizados, tanto de 15% quanto no de 30%, não havendo diferença significativa de sua expressão entre estes grupos. Mas podemos dizer que a expressão da PCNA e, portanto, a proliferação celular, está aumentada com a alcoolização e isto coincide com o aumento da expressão da MT.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- O uso crônico do álcool promove um aumento da expressão da MT;
- A ingestão alcoólica leva ao aumento da expressão da PCNA;
- O aumento da expressão de PCNA coincide com o aumento da MT;
- A espessura epitelial de camundongos alcoolizados é aumentada com a alcoolização, apresentando aumento significativo no grupo alcoolizado à 30%;
- A expressão de p53 está diminuída no grupo de 15%.

Agradecimentos

Pela possibilidade de concluir este trabalho agradeço primeiramente a Deus, responsável por tudo o que sou.

Agradeço à minha família, nas pessoas de minha querida mãe e amiga Vânia, meu pai Paulo e meus irmãos Raphael e Leandro, que estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando. À meus avós que sempre acreditaram em mim.

Agradeço ao meu grande companheiro, amigo e namorado Ricardo, pelo seu amor e dedicação tão importantes para que eu chegasse até aqui.

Às grandes amigas D. Célia, Tânia e Denise, pelo carinho e apoio quando precisei.

À aqueles que também viveram o “drama” da faculdade ao meu lado, meus queridos amigos Ananda, Bellisa, Léo, Rafael, Rúbia e Taísa, os quais eu jamais esquecerei.

Ao meu orientador Adriano, que acreditou em minha capacidade e me possibilitou realizar este trabalho.

Ao grande amigo Paulo que “sofreu” comigo no dia-a-dia do trabalho e que foi muito importante para a conclusão de mais esta etapa de minha vida.

Agradeço à todos aqueles que estiveram direta ou indiretamente ligado à mim e ao meu trabalho ao longo destes anos.

À estes todos que fizeram e fazem parte da minha vida agradeço e dedico todo o meu esforço e conquista.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHRENDT, SA; CHOW, JT; YANG, SC; WU, L; ZHANG, MJ; JEN, J; SIDRANSKY, D. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, v. 60, p. 3155-9, 2000.
- BRUEWER, M; SCHMID, KW; KRIEGLSTEIN, CF; SENNINGER, N; SCHUERMANN, G. Metallothionein: early marker in the carcinogenesis of ulcerative colitis-associated colorectal carcinoma. *World J Surg.*, v. 26, p. 726-31, 2002.
- CHERIAN, MG; JAYASURYA, A; BAY, BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis. *Mutat Res.*, v. 533, p. 201-9, 2003.
- COSTA, EMC. Alcoolização Crônica Experimental em Camundongos: Estudo Morfológico e da Expressão Imunoistoquímica da Metalotioneína em Epitélio Lingual. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2005.
- DOUGLAS-JONES, AG; NAVABI, H; MORGAN, JM; JASANI, B. Immunoreactive p53 and metallothionein expression in duct carcinoma in situ of the breast. *Virchows Arch.*, v. 430, p. 373-9, 1997.
- FARIA, PR; CARDOSO, SV; NISHIOKA, S; SILVA, SJ; LOYOLA, AM. Clinical presentation of patients with oral equamous cell carcinoma when first seen by dentists or physicians in a teaching hospital em Brazil. *Clin Oral Investig.*, v. 7, p. 46-51, 2003.
- FIGUEIRO-RUIZ, H; PELÁEZ, MAC; LAPIEDRA, RC; GÓMEZ, E; LÓPEZ, LAM. Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: Relationship with oral cancer. *Med Oral*, v. 9, p. 14-23, 2004.
- GAIOTTO, MAM; RIBALTA, JCL; FOCCHI, J; STÁVALE, JN; YMAYO, MR; CODÁ, NM. Relação entre a atividade proliferativa do epitélio e a resposta angiogênica estromal em neoplasias intra-

- epiteliais do colo uterino. *RBGO*, v. 22, p. 339-45, 2000.
- HELANDER, A; LINDAHL-KIESSLING, K. Increased frequency of acetaldehyde-induced sister-chromatid exchanges in human lymphocytes treated with an aldehyde dehydrogenase inhibitor. *Mutation Research*, v. 264, p. 103-7, 1991.
- HINDLE, I; DOWNER, MC; MOLES, DR; SPEIGHT, PM. Is alcohol responsible for more intra-oral cancer? *Eur J Cancer*, v. 36B, p. 328-33, 2000.
- HSU, SM; RAINE, L; FANGER, H. The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, v. 29, p. 577-80, 1981.
- KERR, JFR; WINTERFORD, CM; HARMON, BV. Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, v. 73, p. 2013-26, 1994.
- MAIER, H; WEIDAUER, H; ZÖLLER, J; SEITZ, HK; FLENTJE, G; MALL, G; BORN, IA. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcoholism: Clinical and experimental research*, v. 18, p. 387-91, 1994.
- MILES, AT; HAWKSWORTH, GM; BEATTIE, JH; RODILLA, V. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, v. 35, p. 35-70, 2000.
- MILLER, RT; KUBIER, P; REYNOLDS, B; HENRY, T; TURNBOW, H. Blockin of endogenous avidin-biotin activity in immunohistochemistry. The use of skim milk as an economical and effective substitute for commercial biotin solutions. *Appl Imm Mol Morphol.*, v. 7, p. 63-5, 1999.
- MOLL, UM; OSTERMEYER, AG; HALADAY, R; WINKFIELD, B; FRAZIER, M; ZAMBETTI, G. Cytoplasmic sequestration of wild-type p53 protein impairs the G1 checkpoint after DNA damage. *Mol Cell Biol.*, v.16, p.223.-37, 1996.
- NEVILLE, BW; DAY, TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.*, v. 52, p. 195-215, 2002.

- OTTAGGIO, L.; BOZZO, S.; MORO, F.; SPARKS, A.; CAMPOMENOSI, P.; MIELE M.; BONATTI, S.; FRONZA, G.; LANE, DP.; ABBONDANDOLO, A. Defective nuclear localization of p53 protein in a Chinese hamster cell line is associated with the formation of stable cytoplasmic protein multimers in cells with gene amplification. *Carcinogenesis*, v.21, p.1631-8, 2000.
- PARTRIDGE, M.; KIGUWA, S.; EMILION, G.; PATEROMICHELAKIS, S.; A'HERN, R.; LANGDON, JD. New insights into p53 protein stabilisation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.*, v. 3, p.45-55, 1999.
- PÖSCHL, G.; SEITZ, H. Alcohol and cancer. *Alcohol e Alcoholism*, v. 39, p. 155-65, 2004.
- RIBEIRO JR, U; ALVES, VA; SOUZA, PMSB; RIBEIRO, AVS; RAWET, V; NONOGAKI, S; RODRIGUES, JG; HABR-GAMA, A. Correlação das Proteína p53 e Ki-67 com o prognóstico de pacientes com Adenocarcinoma de Reto Distal. *Rev Bras Coloproct*, v. 20, p. 248-56, 2000.
- ROMERO-ISART, N; VASAK, M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J Inorg Biochem.*, v. 88, p. 388-96, 2002.
- RUKKUMANI, R; ARUNA, K; SURESH VARMA, P; MENON, VP. Influence of ferulic acid on circulatory prooxidant-antioxidant status during alcohol and PUFA induced toxicity. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 55, p. 551-61, 2004.
- SABER, R; PISKIN, E. Investigation of complexation of immobilized metallothionein with Zn(II) and Cd(II) ions using piezoelectric crystals. *Biosens Bioelectron.*, v. 18, p. 1039-46, 2003.
- SIMPKINS, CO. Metallothionein in human disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, v. 46, p. 465-88, 2000.
- SUHY, DA; SIMON, KD; LINZER, DI; O'HALLORAN, TV. Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J Biol Chem.*, v. 274, p. 9183-92, 1999.
- TAPIERO, H; TEW, KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomed Pharmacother.*, v. 57, p. 399-411, 2003.

VAUX, DL; FLAVELL, RA. Apoptosis genes and autoimmunity. *Curr Op Immunol*, v. 12, p. 719-24, 2000.

VOUSDEN, KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta.*, v. 1602, p. 47-59, 2002.

WIGHT, AJ; OGDEN, GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence

the development of oral cancer – a review. *Oral Oncology*, v. 34, p. 441-7, 1998.

ZAR, JH. *Biostatistical Analysis*. 4^a ed. New Jersey. Prentice-Hall, Inc., 1999.