

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA**

Vinicius Coelho Carrard

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE ETANOL,
DA CESSAÇÃO DO CONSUMO E DO
CO-TRATAMENTO COM VITAMINA E EM
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E NA
ATIVIDADE PROLIFERATIVA DA LÍNGUA DE RATOS**

Porto Alegre, novembro de 2008.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Vinicius Coelho Carrard

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO CONSUMO DE ETANOL, DA CESSAÇÃO
DO CONSUMO E DO CO-TRATAMENTO COM VITAMINA E EM
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO E NA ATIVIDADE
PROLIFERATIVA DA LÍNGUA DE RATOS**

TESE APRESENTADA COMO PARTE DOS
REQUISITOS OBRIGATÓRIOS PARA
A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR
EM ODONTÓLOGIA (PATOLOGIA BUCAL)

Manoel Sant'Ana Filho

Orientador

José Cláudio Fonseca Moreira

Co-Orientador

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Porto Alegre (RS), novembro de 2008.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Sérgio Luiz e a minha mãe Viviane, por terem sempre apoiado e acreditado nas minhas escolhas quando até eu mesmo duvidei. Pai, me espelho na tua perseverança. Mãe, tu és meu exemplo de dedicação à família. Obrigado por me darem confiança, afeto, por terem contribuído na definição dos meus princípios e por me darem condições para seguir até aqui.

Aos meus irmãos, Michel e Christian, pela compreensão, companheirismo. Que nós nos mantenhamos unidos, crescendo e aprendendo sempre.

A minha querida Jaci Carbonell por todos momentos bons e ruins que dividimos, pela sua grandeza de espírito e pela sua generosidade, pelas lições quase diárias. Tua paciência e tua atenção foram fundamentais para que eu chegasse ao fim dessa jornada.

Ao meu orientador Prof. Manoel Sant' Ana Filho pelos ensinamentos e por acreditar que eu tinha potencial para chegar até aqui. Foram longos anos e espero ter correspondido à expectativa. Deixo a Patologia sabendo que não fui perfeito, mas tranqüilo por ter atingido uma parte considerável dos objetivos a que nos propomos.

Ao meu co-orientador Prof. José Cláudio Fonseca Moreira por ter me aceito como co-orientando, por ter consentido com a realização do trabalho no seu laboratório e me dado atenção e assistência quando precisei. Gostei muito da experiência de trabalhar com vocês no "Lab" e essa oportunidade me proporcionou não só conhecimentos bioquímicos, mas a aquisição de uma visão mais ampla de ciência e pesquisa.

Ao Prof. Pantelis Varvaki Rados pelas lições patológicas e não-patológicas e, principalmente, por ter despertado em mim o gosto pela Patologia Bucal.

À Isabel da S. Lauxen por ser para mim o que o Prof. Barbachan foi para ela. O teu reconhecimento sempre me serviu de combustível ao longo do meu período na Patologia. Muito obrigado.

Aos Professores João Jorge Diniz Barbachan e Onofre Francisco de Quadros (Bagé) por terem sido grandes mestres como hoje em dia não existem mais. Gostaria de ter tido um período de convivência mais longo com vocês.

Ao grande colega de Mestrado e Doutorado Cristiano Macabu Badauy. A experiência de trabalharmos juntos, cada um ao seu estilo, foi muito enriquecedora para mim.

À Sabrina Pozatti Moure pela valorização dos meus conhecimentos patológicos, mas muito mais pela amizade, que nos permitiu compartilhar alegrias e angústias. Obrigado também pela disponibilidade para revisar toda a tese.

As minhas prezadas bolsistas Aline S. Pires e Marina Mendez. A dedicação de vocês ao longo desse trabalho foi uma parte importante da fórmula para termos atingido aquilo que tínhamos planejado. Espero que tenha sido proveitoso para vocês como foi para mim.

A minha colega e amiga Fernanda Visioli pelas discussões científicas e pelo companheirismo, especialmente na hora do *coffee break*.

A Josué Nolde e Luciana D. Alves pelo tempo que me acompanharam como bolsistas voluntários. A experiência teve bons frutos, ainda que o tempo tenha sido curto.

À Nina Paula Margarites pelo ombro e pelos ouvidos sempre disponíveis nos momentos difíceis, pelos elogios a minha comida, pelos xingamentos ao meu temperamento e pela companhia nas horas de descontração.

À Caren Bavaresco, que me ajudou a dar os primeiros passos no mundo da bioquímica e acompanhou o trabalho desde o momento em que ele era apenas uma idéia meio sem rumo na minha cabeça.

Aos colegas de Pós-Graduação Elisabete U. Rojas, Ricardo Paiva, Paula Bohrer, Cristina Baumgart, Ana Luísa H. de Carvalho, Laura de Campos Hildebrand, Francinne Miranda, Fábio Maito, Christine Phillipe, Tatiana Andréa Soares Pinto, Clélia Calvet, Júlio Sanfelice, João Batista Burzlaff, Márcia Gaiger de Oliveira, Simone Luisi, Marilene Fernandes, Berenice Barbachan e Silva, Adriana Jou, Fábio Vieira de Miranda, Alex N. Haas, Eduardo José Gaio, Luciano Casagrande, Carlos Heitor Cunha Moreira, Tiago Fiorini, Diego Liberman e Juliano Cavagni.

À Alessandra de Souza Cunha e a sua família, pelos anos que dividimos e pela confiança na minha capacidade.

Aos meus professores, colegas e amigos Anna Christina Medeiros Fossati e José Antônio Poli de Figueiredo, que dividiram comigo as disciplinas

de Histologia Geral e Buco-Dentária desta faculdade, pelo carinho, pelo crescimento e aprendizado que me proporcionaram e pela segurança que me passaram nos 5 semestres em que tive o prazer de conviver com eles.

Aos demais professores com quem tive contato, em especial, a Cassiano K Rösing, Cristiano Susin, Maria Antonia Z. de Figueiredo, Maria Beatriz Cardoso Ferreira, José Arthur Bogo Chies, Jorge Omar L. de Silveira, Fabiana C. Moresco, Miriam Salvador e Anna Cecília M. Chaves pela suas contribuições na minha formação, principalmente no que diz respeito à construção do espírito crítico.

Aos colegas, Fabiana Grecca, Régis Burmeister dos Santos, Patrícia Kopper, Antonio Izquierdo e Evandro Gomes da Silva, que me oportunizaram a participação em pesquisas em áreas diferentes da Patologia Bucal.

Aos amigos e colegas Marcelo G. Almeida, Rafael Melara, Ramiro Borba Porto, Ricardo Maschmann, Eduardo C. Pinheiro, Adriela Mariath, Guilherme Sieck, Fernando L. Rigo, Marcos Schwengber, Murilo Flores, Rodrigo dos Santos, Luis Felipe Schwengber, Thiago Calcagnotto, Diego Castaman, Vinicius Sausen pelo apoio profissional que me deram.

A toda equipe do Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (Lab. 32) e do Departamento de Bioquímica/UFRGS: Mário C. da Frota Júnior, Rodrigo Dalmolin, Michael Andrades, Rodrigo Lorenzi, Marcos de Oliveira, Evandro G. da Silva, Guilherme Behr, Ana Cristina Andrezza, Daniel Gelain, Fernanda F. Caregnato, Fábio Klamt, Matheus A. B. Pasquali, Alfeu Zanotto Filho, Max William S. de Oliveira, Mariana Hoff, Leonardo Motta, Mariana Escobar, Roxane F. Duarte, Nathalia Trindade, Ricardo Rocha, Rafael S. Pereira, Fernanda Bonatto, Ramatis Birnfeld de Oliveira, Virginia D. Kapell, Amâncio Romanelli da Ferreira, Francilene Amaral da Silva, Luis Gustavo Ravazolo, Mauro A. Castro, Márcio Martins Silveira pela ajuda, pelas aulas informais, pela atenção e pela paciência.

À Patrícia Sesterheim e à Luisa Braga por todo suporte e atenção que me deram junto à FEPPS.

À Adriana Aguiar, Leandro Nunes, Luciana Adolfo e Rosa Maria Savall pela gentileza ao me ajudar na resolução de problemas técnicos, burocráticos e do dia-a-dia.

À equipe da biblioteca Malvina Vianna Rosa, em especial a Mailing Leitão, Norma Beatriz Loureiro Ataíde, Eloisa Futuro Pfitscher, Rejane Raffo Klaes, e Nilza Balbina S. D. P. Brito pelo suporte bibliográfico sempre oferecido de uma forma eficiente e atenciosa.

A Émerson e Cássia Boschi, meus grandes amigos e afilhados, que sempre me incentivaram a me manter firme nesse caminho.

A Christiane Gerhard, pelos conhecimentos farmacológicos e interesse em tentar encontrar os reagentes de que eu precisava.

À Faculdade de Odontologia da UFRGS, onde completei 12 anos de aprendizado entre graduação, extensão e pós-graduação, tendo aprendido muito, mas certo de que ainda sei muito pouco.

À CAPES por ter financiado meus cursos de Mestrado e Doutorado.

Conselho de uma Árvore

“Seja Altaneira e Orgulhosa.

Finque suas raízes profundamente na Terra.

Reflita a luz de uma fonte maior.

Pense a longo prazo.

Arrisque-se...

Seja flexível

Lembre-se de suas raízes.

Aproveite a vista!”

Ilan Shamir

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos consumos agudo e crônico de etanol, da sua cessação e do co-tratamento com vitamina E em parâmetros de estresse oxidativo na mucosa e na atividade proliferativa no epitélio lingual de ratos. Após realizar-se uma revisão de literatura, observou-se que o acúmulo de acetaldeído (um metabólito do etanol), o polimorfismo das enzimas que metabolizam o álcool e o estresse oxidativo poderiam ser mecanismos envolvidos na patogênese do dano pelo álcool na mucosa bucal, sendo o estresse oxidativo escolhido como tema do estudo. Uma amostra de 48 ratos Wistar, fêmeas, com 3 meses, foram divididos em 6 grupos (álcool, álcool cessação, álcool vitamina E, controle, tween e vitamina E). O grupo tween recebeu solução de 5% de Tween 80 (veículo da vitamina E) por meio de gavagem enquanto os outros animais receberam solução salina. Após 14 dias os animais foram anestesiados e uma biópsia foi realizada no centro do dorso da língua. Esse material foi utilizado para análise do efeito do consumo agudo de etanol e do co-tratamento com vitamina E em parâmetros de estresse oxidativo (TBARS, grupos carbonil, atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase-SOD e catalase-CAT e relação SOD/CAT). Após 60 dias de experimento, os animais do grupo álcool cessação tiveram o álcool substituído por água. Após 120 dias, os animais foram mortos e as línguas foram removidas. Esse material foi utilizado para a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo (TBARS, grupos carbonil, SOD, CAT e relação SOD/CAT, imunocontêúdos da CAT e do Nrf2), da atividade proliferativa (AgNORS) e da possível relação entre ambos. Os animais submetidos ao tratamento agudo com álcool mostraram redução dos níveis de TBARS. A atividade da CAT foi mais alta no grupo álcool vitamina E após o tratamento agudo. O consumo crônico de etanol induziu aumento da atividade proliferativa no epitélio do ventre da língua quando comparado ao grupo controle. Esse efeito foi atenuado pela cessação do consumo. Além disso, houve aumento da atividade da CAT e diminuição dos níveis de TBARS nesse grupo. O grupo álcool vitamina E mostrou maior atividade

proliferativa em relação ao grupo vitamina E e maior atividade da SOD, indicando que o co-tratamento com vitamina E não teve efeito protetor nos tecidos linguais. Conclui-se que o aumento da proliferação relacionado ao álcool no epitélio lingual não está associado ao estresse oxidativo. Uma vez que o dano provocado pelo álcool foi revertido, é possível sugerir que o álcool atua como um promotor de câncer bucal.

Palavras-chave: etanol, estresse oxidativo, mucosa bucal, câncer bucal, proliferação de células.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effects of acute and chronic alcohol consumption, alcohol consumption cessation and vitamin E co-treatment on rats tongue mucosa oxidative stress parameters and on tongue epithelium proliferative activity. After to conduce a literature review it was observed that acetaldehyde accumulation (an alcohol metabolite), the polymorphism of alcohol metabolization enzymes and oxidative stress could be mechanisms related to pathogenesis of alcohol damage in oral mucosa, and the former was choosen for the study. Forty-eight Wistar rats, female, 3 months-old were separated into 6 groups (alcohol, alcohol cessation, alcohol vitamin E, control, vitamin E, tween, vitamin E). The tween group received 5% tween 80 (vitamin E vehicle) by gavage, and the other animals received saline. At day 14, the animals were anesthetized and a biopsy was performed on tongue dorsum. In this sample, it was evaluated the acute alcohol consumption and vitamin co-treatment effects on oxidative stress parameters (thiobarbituric acid reactive substances-TBARS, carbonyl groups, superoxide dismutase activity-SOD and catalase activity-CAT and SOD/CAT ratio). After 60 days, 40% (v/v) ethyl alcohol was replaced with water in the alcohol cessation group. Vitamin E was given by gavage to animals in the alcohol/vitamin E and vitamin E groups. After 4 months, the animals were killed and the tongue was removed. Cell proliferation rate was evaluated using AgNOR quantification in histological sections. Oxidative stress parameters (TBARS, carbonyl groups, SOD and CAT, CAT and Nrf2 immunocontent) were quantified in tongue homogenates as well as the association between oxidative parameters and cell proliferation. The animals subjected to acute alcohol treatment showed TBARS decrease. SOD activity was lower and CAT activity was higher in alcohol and vitamin E group after acute treatment. Chronic alcohol consumption induced increase in cell proliferation rates of ventral tongue epithelium when compared to the Control group. This effect was attenuated after alcohol cessation. In addition, an imbalance of superoxide dismutase and catalase activities and decrease in TBARS were found in this group. The alcohol/vitamin E group showed higher proliferation rate than the Vitamin E group, suggesting that vitamin E co-

treatment had no protective effects on the tongue tissues. It was concluded that the alcohol-related cell proliferation increase in tongue epithelium is not associated to oxidative stress parameters. Since the alcohol damage was reversible, it is possible to suggest that alcohol acts as an oral cancer promoter.

Keywords: ethanol, oxidative stress, oral mucosa, oral cancer, cell proliferation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquemas

Esquema 1 - Estresse Oxidativo.....	20
Esquema 2 - Mecanismo sugerido para atenuação do aumento da atividade proliferativa no grupo álcool cessação.....	88

Figuras

2º Artigo – “EFFECTS OF ACUTE ALCOHOL CONSUMPTION AND VITAMIN E CO-TREATMENT UPON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN RATS TONGUE”

Figure 1 - Oxidative damage parameters.....	57
Figure 2 - Antioxidant enzymes activities.....	58
Figure 3 - Theoretical model of vitamin E protective mechanism.....	59

3º Artigo – “CESSATION ATTENUATES ALCOHOL-RELATED CELL PROLIFERATION INCREASE ON TONGUE EPITHELIUM OF RATS”

Figure 1 - Cell proliferation rate in suprabasal layer cells of ventral tongue epithelium.....	79
Figure 2 - TBARS and carbonyl groups in tongue tissues.....	80
Figure 3 - SOD and CAT activities and SOD/CAT ratio.....	81
Figure 4 - CAT and Nrf2 immunocontent parameters.....	82
Figure 5 - Correlation between cell proliferation rate (pAgNOR) and oxidative stress	83

LISTA DE TABELAS

2º Artigo – “EFFECTS OF ACUTE ALCOHOL CONSUMPTION AND VITAMIN E CO-TREATMENT UPON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN RATS TONGUE”

Table 1 - Alcohol concentration increase per day in adaptation phase..... 56

Table 2 - Standard chow diet and solutions (water and 40% ethanol solution) consumption..... 56

Table 3 - Initial and final weight (g) and change in body weight (%) of female Wistar rats in different experimental groups..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADH	álcool-desidrogenase
AgNOR	proteínas argirofílicas associadas as regiões organizadoras nucleolares ativas
ALDH	aldeído-desidrogenase
α	alfa
ANOVA	teste da análise da variância
β	beta
BrdU	bromodioxiidina
CAPES Superior	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
CAT	catalase (enzima antioxidante)
CNPq Tecnológico	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	dioxido de carbono
CYP 2E1	enzimas microssomais pertencem à família de proteínas chamadas citocromos responsáveis pela oxidação do etanol
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNPH	dinitrofenilhidrazina
ERRO	espécies reativas de oxigênio
FAPERGS	Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul
FEPPS	Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde
GPx	glutathiona peroxidase
G	gramas
° C	graus Celsius
h	horas
HCl	ácido clorídrico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
=	igual
kg	quilograma
Ki67	marcador de proliferação

LTDA	sociedade limitada
M	molar
mAgNOR	média do número de AgNORs/núcleo
+/-	mais ou menos
MDA	malondialdeído
<	menor
MEOS	sistema microssomal de degradação do etanol
mg	miligramas
mg/well	miligrama por poço
µm	micrômetro
mM	micromolar
min	minutos
ml	mililitros
µL	microlitros
MO	Missouri
MPx	megapixel
NaCl	cloreto de sódio
nm	nanômetros
Nrf2	fator relacionado à eritróide nuclear 2 (fator de transcrição redox-sensível)
n	número amostral
O ₂ ⁻	radical superóxido
OH ⁻	hidroxila
p	nível de significância
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i> (eletroforese em gel de poliacrilamida)
pAgNOR >1	percentual de células com mais do que 1 AgNOR
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (tampão fosfato salina)
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PG2	prostaglandina 2
PGF2	prostaglandina F2
pH	potencial hidrogeniônico
%	por cento

P450 2E1	enzimas microsossomais pertencem à família de proteínas chamadas citocromos responsáveis pela oxidação do etanol
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i> (polifluoreto de vinilideno)
r	coeficiente de correlação de Pearson
RL	radicais livres
ROS	espécies reativas de oxigênio
rRNA	ácido ribonucléico ribossomal
6-keto-PGF1	prostaglandina 6-ceto F1
SOD	superóxido-dismutase.
SOD/CAT ratio	relação SOD/CAT
SP	São Paulo
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico: teste bioquímico para quantificação da peroxidação lipídica.
TTBS	<i>tween-tris buffered saline</i> (solução tampão tween-tris)
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USA	<i>United States of América</i> (Estados Unidos da América)
V	volume
Vol	volume

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	11
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	13
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	24
3. RESULTADOS.....	25
1º ARTIGO - ÁLCOOL E CÂNCER BUCAL: CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MECANISMOS RELACIONADOS.	
Resumo.....	26
Introdução.....	27
Revisão de Literatura.....	27
Conclusões.....	30
Referências.....	30
Abstract.....	33
2º ARTIGO - EFFECTS OF ACUTE ALCOHOL CONSUMPTION AND VITAMIN E CO-TREATMENT UPON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN RATS TONGUE.	
Title page.....	34
Abstract	35
Introduction.....	36
Materials and Methods.....	37
Results.....	40
Discussion.....	42
Conclusion.....	47
References.....	47
Table 1.....	56
Table 2.....	56
Table 3.....	56
Figure 1	57

Figure 2	58
Figure 3	59

3º ARTIGO - CESSATION ATTENUATES ALCOHOL-RELATED CELL
PROLIFERATION INCREASE ON TONGUE EPITHELIUM OF RATS.

Title Page.....	60
Abstract.....	61
Introduction.....	62
Materials and Methods.....	63
Results.....	67
Discussion.....	69
References.....	74
Figure Legends.....	78
Figure 1.....	79
Figure 2.....	80
Figure 3.....	81
Figure 4.....	82
Figure 5.....	83
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
5. CONCLUSÕES.....	90
6. REFERÊNCIAS	91

1. INTRODUÇÃO

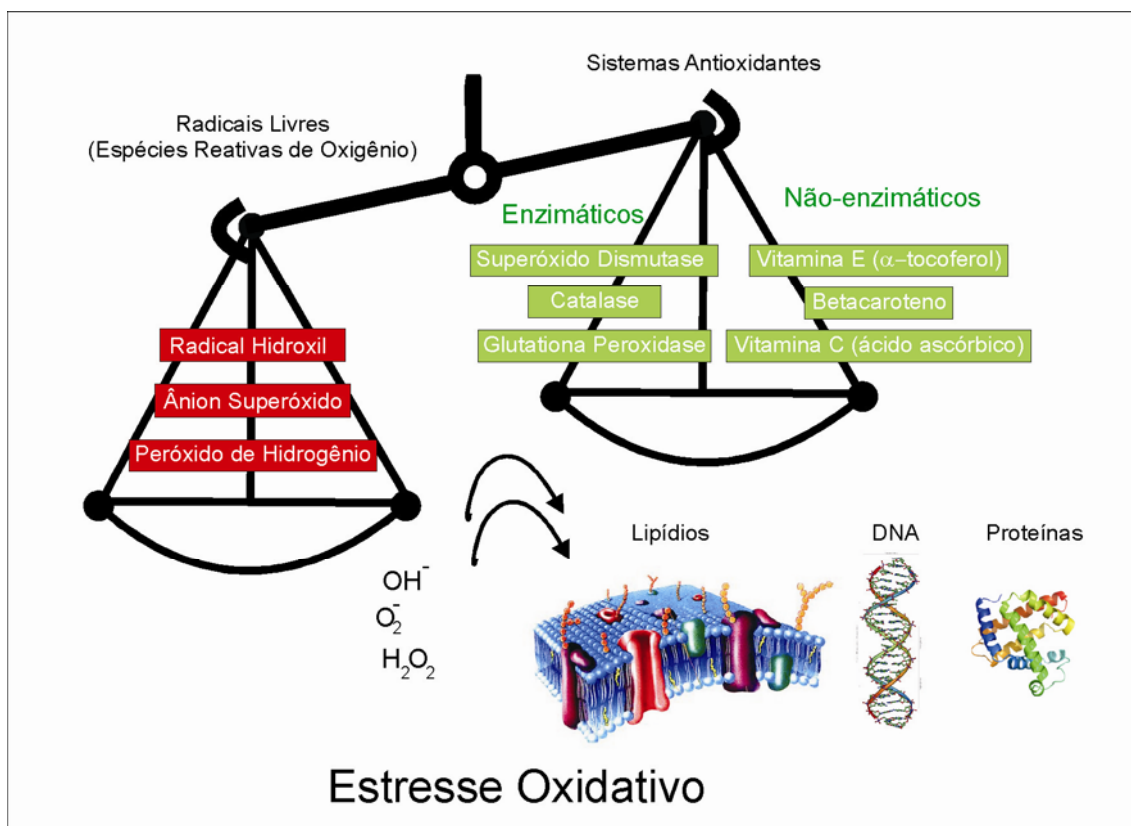
O consumo de etanol tem sido apontado como um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular de boca (câncer de boca). Esta relação é ainda mais evidente quando há a associação com o hábito de fumar (WYNDER, MUSHINSKI, SPIVAK, 1977; ROTHMAN, 1978; RICH, RADDEN, 1984; FRANCO et al., 1989; LLEWELLYN, JOHNSON, WARNAKULASURIYA, 2004). Os estudos a respeito dos efeitos do etanol encontram uma série de dificuldades na sua realização, pois os indivíduos geralmente consomem bebidas com diferentes graduações alcoólicas e são imprecisos ao informar a respeito das quantidades ingeridas (BRUGERE et al., 1986; KABAT, WYNDER, 1989). Outro problema nesses estudos é avaliar a sua ação isolada na mucosa bucal, já que a maioria dos indivíduos que consome bebidas alcoólicas também tem o hábito de fumar.

Ensaio experimentais com animais expostos ao tabaco e ao etanol reforçaram a associação entre ambos, demonstrando o desenvolvimento de lesões menos diferenciadas e num período mais curto nos animais expostos aos dois agentes quando comparados àqueles expostos exclusivamente ao tabaco (FREEDMAN, SHKLAR, 1978). Apesar disso, os mecanismos pelos quais o etanol provoca alterações ainda não estão completamente compreendidos (WIGHT, OGDEN, 1998; FIGUERO-RUIZ et al, 2004).

Os estudos de Valentine et al. (1985) e de Maier et al. (1994) demonstraram que o consumo de etanol isoladamente provocava aumento da proliferação celular no epitélio bucal de humanos e de ratos respectivamente. Posteriormente, estudos foram realizados no Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia/UFRGS. Inicialmente, buscou-se determinar se as alterações do epitélio bucal decorrentes do consumo de etanol eram provocadas pela ação local (ação direta) ou pela ação sistêmica (indireta). Sanfelice (2001) utilizou uma análise morfométrica para inferir a respeito da proliferação celular e do processo de descamação do epitélio. Foi encontrada redução na proliferação celular e aumento da descamação do epitélio dos animais que consumiam etanol. Maito (2001) avaliou proliferação celular por meio da marcação do PCNA (Antígeno

Nuclear de Proliferação Celular) e encontrou aumento da imunomarcagem na mesma amostra e em função do mesmo tratamento. Os resultados pareciam apontar para uma contradição entre os resultados encontrados nesses dois estudos: como o tratamento poderia levar ao aumento da proliferação celular e redução da espessura epitelial no mesmo grupo de animais? Como essa discrepância poderia ser causada pela expressão do PCNA durante o reparo de DNA (TOSCHI, BRAVO, 1988) ou por sua meia-vida longa (SCOTT et al., 1991; ALISON, BEST, 1998), surgiu a idéia de um terceiro estudo a ser realizado com o mesmo material. Esse terceiro estudo seria a possibilidade de dar mais suporte aos dados já existentes e resolver esta aparente contradição. Além disso, a utilização de um segundo marcador de proliferação atenderia a uma recomendação acerca estudos envolvendo proliferação celular (RÜSCHOFF et al. 1994), dando mais confiabilidade aos resultados.

A quantificação das AgNORs foi a técnica escolhida, pois permitiria inferir a respeito de taxa de proliferação celular (*cell proliferation rate*), ou seja, velocidade do ciclo celular, diferentemente dos marcadores de proliferação celular como PCNA, BrdU e Ki67, que indicam apenas as células que estão se dividindo (*cell growth*) no tecido estudado (SIRRI et al., 1997; SIRRI, ROUSSEL, HERNANDEZ-VERDUN, 2000). A técnica de AgNOR utiliza nitrato de prata, que tem afinidade pelas proteínas ácidas não histônicas nucleolina e nucleofosmina, cujas presenças têm relação com biogênese ribossomal e, conseqüentemente, com atividade proliferativa. Carrard et al. (2004) analisaram a mesma amostra de Maito (2001) e Sanfelice (2001) pela técnica de AgNOR, confirmando que a atividade proliferativa estava aumentada no epitélio lingual de ratos que consumiam etanol por 12 meses. A partir da análise dos resultados desses estudos pode-se sugerir que a atividade proliferativa aumentada seria uma resposta ao aumento da descamação de células nas camadas mais externas do epitélio lingual. Contudo, esse aumento da proliferação celular não seria o suficiente para compensar a maior perda de células na superfície, resultando na redução das espessuras epitelial e de ceratina. Na medida em que ocorre a aceleração do *turn over* epitelial, a diferenciação celular e o processo de ceratinização aconteceriam de forma incompleta, reforçando o que os estudos anteriores mostravam (VALENTINE et al., 1985).



Esquema 1 - Estresse oxidativo. Adaptado a partir de Garrido et al., 2004.

O estresse oxidativo é um mecanismo relacionado ao dano pelo consumo de etanol em diversos órgãos e tecidos como fígado (EKE, VURAL, ISCAN, 1996), rim (PARI, SURESH, 2008) e tecido nervoso (EMRE et al., 2007). Esse estado se caracteriza por um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e a capacidade dos tecidos em neutralizá-los por meio das defesas antioxidantes (Esquema 1). Radicais livres (RLs) são elementos altamente instáveis, uma vez que apresentam um elétron não pareado na sua órbita mais externa. Em função disso, os RLs são muito reativos e buscam equilibrar a sua distribuição molecular, capturando um elétron de uma molécula ou ligando-se a mesma (WU, CEDERBAUM, 2003). Segundo Chance, Sies, Boveris (1979), cerca de 2-3% do oxigênio consumido pela cadeia respiratória são convertidos em RLs ou seus precursores chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO). Como este é um processo que ocorre fisiologicamente, o

organismo possui mecanismos para prevenir ou neutralizar a formação de ERO. Os mecanismos de defesa antioxidante podem ser do tipo enzimático, que inclui as enzimas superóxido-dismutases (SODs), a catalase (CAT) e a glutationala peroxidase (GPx) e não enzimático, que conta com elementos obtidos pela dieta (McDONOUGH, 2003). As SODs catalizam a rápida remoção de radicais superóxidos, reduzindo-os a peróxido de hidrogênio, que é menos reativo. Este, por sua vez, pode ser reduzido à água por outras enzimas como a CAT e a GPx. Em mamíferos, existem vários tipos de SODs, que diferem em relação a sua localização na célula e ao metal necessário para a sua atividade. A SOD cobre-zinco está presente no citosol e entre as membranas mitocondriais, já a SOD contendo manganês localiza-se na matriz mitocondrial (WU, CEDERBAUM, 2003). Essas enzimas são essenciais para a prevenção da toxicidade induzida pelas ERO (FRIDOVICH, 1997). Os mecanismos antioxidantes não enzimáticos envolvem o ácido ascórbico (vitamina C), o beta-caroteno (precursor da vitamina A) e o α -tocoferol (vitamina E). Esses elementos têm a capacidade de seqüestrar os elétrons não pareados dos RLs, revertendo ou estacionando o dano oxidativo (LLESUE, 2002; McDONOUGH, 2003).

O metabolismo do etanol pode induzir estresse oxidativo, pois suas metabolizações hepática e extrahepática geram radicais livres, como as ERO, principalmente quando a P450 2E1 é utilizada como rota de desintoxicação (NAVASUMRIT, 2000; NIETO, FRIEDMAN, CEDERBAUM, 2002; McDONOUGH, 2003). Além disso, o consumo de etanol produz alterações do trato digestivo, contribuindo para a má absorção de vitaminas e compostos derivados do metabolismo secundário de vegetais e animais (antioxidantes não-enzimáticos), o que favorece ainda mais o estresse oxidativo (THOMSON, 1978; YU, 1994). Um exemplo disso é a vitamina A, que se encontra com seus níveis reduzidos, na medida em que é estocada no fígado, o principal órgão afetado pelo consumo de etanol (LIEBER, 1988; JOHNSON, 1995). Os RLs e as ERO que não são neutralizados pelos mecanismos antioxidantes podem reagir com proteínas, lipídios (lipoperoxidação) ou mesmo com o DNA formando complexos e danificando-os (ESPINA et al., 1988; McDONOUGH, 2003; WU, CEDERBAUM, 2003). Como estas ligações são estáveis, diferentes funções celulares podem ser perturbadas como, por

exemplo, o transporte intracelular e a síntese protéica. Esse processo prejudica muitas funções celulares e pode, inclusive, inviabilizá-las (ESPINA et al., 1988; McDONOUGH, 2003; WU, CEDERBAUM, 2003). O malondialdeído (MDA) é um dos principais produtos da lipoperoxidação, portanto é um dos biomarcadores mais utilizados para a sua quantificação e pode ser estimado pelo teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A quantificação das TBARS determina de forma indireta a lipoperoxidação em tecidos e fluidos animais e humanos. É um método indireto para avaliar estresse oxidativo, porém é o método mais utilizado e de fácil realização (LLESUE, 2002). A ação dos radicais livres sobre as proteínas pode ser quantificada pelo teste dos grupos carbonil, que são o resultado da oxidação dos grupamentos carboxil dessas moléculas, os quais passam a ter afinidade pela dinitrofenilhidrazina. Os RLs podem, ainda, atacar o DNA, provocando mutações como quebras simples e duplas na sua fita (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007). Ainda que o organismo possua mecanismos de reparo, um reparo inadequado do DNA alterado como uma substituição de bases ou deleção poderia levar à carcinogênese (DREHER, JUNOD, 1996; MARNETT, 2000).

Alguns estudos têm mostrado que, frente ao aumento da capacidade antioxidante do organismo, observa-se uma atenuação ou reversão dos danos provocados pelo consumo de etanol. Zhou, San, Kang (2002) verificaram que em camundongos nos quais se induziu uma maior expressão de metalotioneína, um potente antioxidante, houve uma prevenção nos danos hepáticos observados frente ao consumo de etanol. Em outro estudo, Sadrzadeh et al. (1995), encontraram que a suplementação de altas doses de vitamina E não modificou os níveis de TBARS em tecidos hepáticos de indivíduos alcoolistas. Por outro lado, Vincon et al. (2003) demonstraram que o aumento de proliferação celular observado no epitélio intestinal de camundongos que consumiam etanol foi atenuado quando lhes era administrada vitamina E. Esses achados sugerem não só que o aumento da proliferação celular pode ser uma resposta à elevação dos níveis de ERO, mas também que o dano provocado pode ser reversível. Contudo, o efeito da cessação do consumo de etanol, bem como o co-tratamento com vitamina E, são situações ainda pouco exploradas na literatura (FRANCESCHI et al., 2000; CASTELLSAGUÉ et al., 2004). Considerando que as ERO atuam como

sinalizadores para processos fisiológicos como a proliferação e diferenciação celulares, é possível que o estresse oxidativo ou o desbalanço na atividade das enzimas antioxidantes tenham relação com o aumento da proliferação celular no epitélio bucal frente ao consumo crônico de etanol. Nem mesmo estudos a respeito do efeito agudo do consumo de etanol sobre tecidos bucais podem ser encontrados na literatura no que diz respeito ao estresse oxidativo.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do consumo de etanol em parâmetros de estresse oxidativo e na atividade proliferativa em tecidos linguais de ratos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. A partir de uma revisão de literatura, descrever os possíveis mecanismos que poderiam explicar o maior risco de desenvolvimento de câncer de boca frente à exposição ao etanol (1º Artigo);
2. Avaliar o efeito do consumo agudo de etanol e do co-tratamento com vitamina E em parâmetros de estresse oxidativo nos tecidos linguais de ratos (2º Artigo);
3. Avaliar o efeito do consumo crônico de etanol, da sua cessação e do co-tratamento com vitamina E em parâmetros de estresse oxidativo nos tecidos linguais de ratos e na atividade proliferativa no epitélio lingual, bem como avaliar a existência de relação entre ambos (3º Artigo);

3. RESULTADOS - ARTIGOS PRODUZIDOS

- 1º Artigo** ÁLCOOL E CÂNCER BUCAL: CONSIDERAÇÕES SOBRE OS MECANISMOS RELACIONADOS. Revista Brasileira de Cancerologia, v. 54, n.1, p.49-56, 2008.
- 2º Artigo** EFFECTS OF ACUTE ALCOHOL CONSUMPTION AND VITAMIN E CO TREATMENT UPON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN RATS TONGUE. (*Manuscrito submetido ao periódico Food And Chemical Toxicology em 23.04.2008 – Em fase de respostas*).
- 3º Artigo** CESSATION ATTENUATES ALCOHOL-RELATED CELL PROLIFERATION INCREASE ON TONGUE EPITHELIUM OF RATS. (*Manuscrito submetido ao periódico Carcinogenesis*).

Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados

Alcohol and Oral Cancer: Comments on Related Mechanisms

Vinícius Coelho Carrard¹, Aline Segatto Pires², Ricardo Losekann Paiva¹, Anna Cecília Moraes Chaves¹, Manoel Sant'Ana Filho¹

Resumo

O consumo de álcool é um dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer bucal; entretanto, os mecanismos envolvidos no dano gerado pelo álcool são parcialmente compreendidos. Determinadas concentrações de álcool causam aumento da permeabilidade da mucosa bucal, potencializando a penetração de carcinógenos. Além disso, é responsável por um aumento na proliferação epitelial, bem como pela modificação do seu processo de maturação. Outras alterações, como redução da capacidade de reparo de DNA, distúrbios do sistema imune e do estado nutricional podem contribuir na sua relação com o desenvolvimento do câncer bucal. O metabolismo do álcool aumenta a produção de radicais livres e diminui os mecanismos antioxidantes, levando ao estresse oxidativo. O polimorfismo genético das enzimas de degradação do álcool pode ser responsável pela diferença na sensibilidade individual. Algumas isoformas dessas enzimas permitem o acúmulo de metabólitos tóxicos como o acetadeído, que pode causar dano ao DNA ou a outras estruturas celulares. A partir de uma revisão de literatura, esse trabalho tem como objetivo estabelecer uma relação entre os diferentes mecanismos da ação do álcool e a carcinogênese na cavidade oral.

Palavras-chave: Etanol, Carcinoma de células escamosas, Mucosa bucal

¹Programa de Pós-graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Porto Alegre (RS), Brasil

²Curso de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Porto Alegre (RS), Brasil
Endereço para correspondência: Vinícius Coelho Carrard. Rua Ramiro Barcelos, 2492 - apto. 503 - Porto Alegre (RS), Brasil - CEP: 90035-003.
E-mail: vcarrard@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O consumo de álcool é um dos principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do câncer de boca. O dano provocado pelo consumo de álcool na mucosa oral pode ser resultado de sua ação direta, pela sua presença na corrente sanguínea ou de sua atuação sobre outros sistemas. Diversos mecanismos podem influenciar a mucosa oral, não estando claro na literatura qual desses seria o mais importante no que diz respeito à carcinogênese em boca. A partir de uma revisão de literatura, este trabalho tem como objetivo estabelecer uma relação entre os diferentes mecanismos da ação do álcool e a carcinogênese na cavidade oral.

Os artigos foram localizados através de busca na base de dados Medline, fazendo o cruzamento das palavras "oral mucosa" e "alcohol". Dentre os trabalhos encontrados, foram selecionados aqueles que se enquadravam no enfoque do trabalho e mais relevantes em termos de delineamento e resultados encontrados. Alguns artigos citados nesses trabalhos foram utilizados, a fim de trazer informações complementares.

REVISÃO DE LITERATURA

O consumo de álcool (etanol) tem aumentado em várias populações, e a faixa etária dos indivíduos consumidores tem sido cada vez mais baixa^{1,2}. Diversos estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de álcool é um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular, que é o tipo de câncer mais comum na cavidade oral³⁻⁹.

Esta relação é ainda mais evidente quando há associação com o hábito de fumar, o que se observa na maioria dos indivíduos, dificultando o estudo de sua ação isolada^{6,9-14}.

O estudo dos efeitos do consumo de álcool na cavidade oral encontra uma série de dificuldades, pois os indivíduos geralmente ingerem diferentes graduações alcoólicas e são imprecisos ao informar a respeito das doses ingeridas, quando questionados^{3,15,16}.

Segundo Mashberg *et al.*¹¹, bebidas como cerveja e vinho aumentariam mais o risco de câncer bucal do que *whisky*. Contudo, a quantidade total de álcool ingerida^{17,18} e o tempo de duração do hábito¹⁹ são mais importantes do que o tipo de bebida alcoólica ingerida.

Mesmo que estudos demonstrem alguns mecanismos por meio dos quais o álcool provoca alterações, não existe ainda uma completa compreensão de como eles podem modificar a mucosa bucal no sentido de desenvolver um carcinoma espinocelular^{20,21}.

Estudos *in vitro* mostram que, a partir da aplicação tópica, o álcool modifica a permeabilidade da mucosa bucal. Isto parece uma boa explicação para o sinergismo

entre consumo de álcool e fumo no desenvolvimento de câncer de boca, uma vez que o consumo de bebidas com concentração alcoólica entre 15% e 25% facilitaria a penetração de diferentes substâncias, inclusive as carcinogênicas presentes no fumo²²⁻²⁴. Por um mecanismo ainda desconhecido, o álcool impede que as células epiteliais organizem a barreira de permeabilidade, composta principalmente de lipídios que têm a função de impedir a desidratação e a penetração de agentes externos^{25,26}. Além disso, é provável que a ação do fumo e álcool sobre os outros sistemas tenha uma contribuição considerável.

A mucosa bucal não é local preferencial para a degradação do álcool, mas alguma quantidade é absorvida e metabolizada em nível tecidual durante a deglutição. Através da principal rota de degradação, o álcool é convertido pela enzima álcool-desidrogenase (ADH) em acetaldeído, e este em acetato pela enzima aldeído-desidrogenase (ALDH). Posteriormente, o acetato chega até diferentes partes do organismo, onde pode ser utilizado para produzir energia ou outras moléculas úteis pela rota de degradação comum à da glicose. Entretanto, a atividade da ALDH é baixa na boca, podendo haver acúmulo de acetaldeído no epitélio bucal^{27,28}.

Usualmente, o acetaldeído é rapidamente convertido em acetato, mas em determinadas situações pode haver o seu acúmulo: o consumo contínuo ou de altas doses de álcool, bem como degradação parcial pela presença de enzimas (ALDH) com atividade limitada. Segundo Bird *et al.*²⁹ e Dellarco³⁰, o acetaldeído é um metabólito tóxico capaz de provocar a quebra da dupla fita de DNA e de formar complexos (*adducts*) com diferentes moléculas, principalmente com proteínas, o que compromete o metabolismo celular.

Há diferentes isoformas de ADH e ALDH, codificadas por diferentes genes, o que determina uma variabilidade étnica e individual na capacidade de degradação do álcool, ocorrendo, em alguns indivíduos, o acúmulo de acetaldeído a partir da ingestão de quantidades relativamente pequenas de álcool^{28,31}. Harty *et al.*³² demonstraram que os indivíduos portadores da ADH3 (alelo da rápida metabolização do álcool) apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de câncer de boca, quando comparados com os indivíduos portadores da ADH1. Entre as ALDH encontram-se as isoenzimas ALDH1 e ALDH2. A ALDH2 é predominante na população japonesa e chinesa, possuindo uma menor capacidade de oxidação do acetaldeído. Portanto, essas populações estariam mais suscetíveis aos danos provocados pelo consumo de álcool, uma vez que acumulam acetaldeído mais facilmente^{27,33}. Segundo Yokohama *et al.*³⁴ e Väkeväinen *et al.*³⁵, indivíduos portadores da ALDH2 inativa têm um maior risco para o desenvolvimento de câncer de boca. Existe, ainda,

uma diferença no metabolismo relacionada ao sexo, pois nas mulheres a ADH é menos ativa³⁶. Esses estudos são controversos, mas é provável que o polimorfismo das enzimas que degradam o etanol tenha uma contribuição na suscetibilidade individual ao desenvolvimento do câncer bucal.

Após a demonstração de que a microbiota bucal teria a capacidade de metabolizar álcool em acetaldeído, surgiram novas especulações quanto a possíveis mecanismos envolvidos no dano pelo consumo de etanol^{37,38}. A má higiene bucal promoveria uma maior produção de acetaldeído, pois permite um maior acúmulo microbiano³⁹. Estudos demonstraram a *Cândida albicans*³⁹ e a *Neisseria*⁴⁰ como espécies que se destacam na produção de acetaldeído por possuírem alta atividade de ADH, estando mais presentes na microbiota bucal de indivíduos alcoolistas. Uma vez que o acetaldeído é produzido a partir de microrganismos bucais em indivíduos com higiene bucal deficiente³⁸, pode-se explicar a relação entre *status* bucal e risco de desenvolvimento de câncer de boca^{41,42}.

Alguns estudos analisaram a influência do consumo de álcool na morfologia e no processo de renovação celular do epitélio bucal. A maioria deles concorda que o consumo crônico de álcool provoca uma diminuição da sua espessura⁴³⁻⁴⁶. Ogden *et al.*²¹ e Larentis *et al.*⁴⁷ concordam que essa redução de espessura seria o resultado do aumento da descamação celular, apesar de alguns autores terem mostrado que ela poderia decorrer da redução do volume das células^{45,48,49}.

Maier *et al.*⁴³, Homman *et al.*³⁷, Maito *et al.*⁵⁰ e Carrard *et al.*⁵¹ mostraram um aumento da proliferação celular decorrente do consumo crônico de álcool, enquanto Mascres *et al.*⁴⁴, Martinez *et al.*⁴⁹, Martinez *et al.*⁴⁸ e Slomiany *et al.*⁵² relacionaram-no com um aumento da autólise ou morte celular. Embora esses resultados pareçam inicialmente contraditórios, nada impede que o aumento da proliferação celular nas camadas mais profundas do tecido epitelial seja uma resposta adaptativa ao aumento da morte celular nas camadas mais externas, a fim de que seja mantida a homeostase⁵¹. Conclui-se dessa forma que o aumento da proliferação celular estaria atuando de maneira compensatória para manter a integridade do tecido epitelial, e poderia favorecer uma maior ocorrência de mutações e danos cumulativos, levando ao desenvolvimento do câncer.

O processo de maturação epitelial parece também ser influenciado pela ingestão de álcool. Isso fica evidente através da observação de vesículas lipídicas^{44,48,49} e da maior expressão de citoqueratina 14³⁷ nas células epiteliais das mucosas de animais que consomem álcool e conseqüentemente denota uma alteração do metabolismo lipídico, o que pode influenciar a organização da barreira de permeabilidade que,

normalmente, impede a penetração de antígenos e substâncias do meio externo.

Experimentos, nos quais o acetaldeído foi administrado a animais³⁷, mostraram alterações semelhantes às encontradas na mucosa bucal após o consumo de álcool^{37,43,50,51}, indicando que o acetaldeído pode ser o principal responsável pelo dano gerado pelo álcool⁵³.

Vários autores sugerem que o álcool tem efeito no mecanismo de reparo de DNA. Alguns experimentos têm demonstrado que o consumo crônico de álcool diminui a capacidade de promover reparos do DNA frente a mutações⁵⁴⁻⁵⁷.

A partir da análise dos diferentes estudos realizados, depreende-se que os efeitos do consumo de álcool ocorrem devido a uma sobreposição de fatores locais e sistêmicos²⁰.

O principal órgão de degradação do álcool é o fígado, onde, além da ADH, existem mais duas rotas de metabolização: sistema microsomal de degradação do etanol (MEOS) e a rota da catalase⁵⁸. O MEOS envolve o retículo endoplasmático liso, encontrando-se mais desenvolvido nos hepatócitos de alcoolistas. As enzimas microsomais pertencem à família de proteínas chamadas citocromos, sendo que a responsável pela oxidação do etanol chama-se P450 2E1 ou CYP 2E1⁵⁹. Como muitos pró-carcinógenos são ativados por essa rota enzimática, poderia se esperar uma maior ativação de carcinógenos frente à ingestão contínua de álcool^{60,61}. A rota da catalase é pouco conhecida e, em termos quantitativos, tem pouca participação na degradação do etanol.

O fígado é um dos principais prejudicados pelo consumo de álcool, que provoca determinados tipos de esteatoses, cirroses e hepatites²⁸. Estando o fígado incapacitado de depurar toxinas, estas se manteriam no sangue e poderiam afetar outros tecidos a distância, por exemplo, a mucosa bucal⁶². Também não pode ser descartada a hipótese das alterações hepáticas serem responsáveis pela má estruturação da barreira de permeabilidade da mucosa bucal, uma vez que no fígado ocorre o metabolismo dos lipídios. Existe ainda a possibilidade de uma menor disponibilização de vitaminas, pois essas são processadas no fígado^{63,64}.

O sistema imunológico também é afetado pelo uso do álcool⁶⁵. Segundo Lundy *et al.*⁶⁶, Gallucci *et al.*⁶⁷ e Wang *et al.*⁶⁸, há uma diminuição do número e da função das células de defesa do sangue, como as células T e as "natural killer". Isso explica o pobre prognóstico observado em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço que consomem habitualmente álcool. Por outro lado, aqueles indivíduos que se abstiveram do consumo, por pelo menos um ano, antes do estabelecimento do diagnóstico de câncer, apresentaram uma sobrevida maior⁶⁹. Percebe-se, portanto, que, além de contribuir

no surgimento do câncer, o consumo de etanol parece ter um papel na evolução da doença.

Somando-se a isto, o alto valor calórico do álcool faz com que o alcoolista se alimente mal, potencializando ainda mais esse estado de imunossupressão^{70,71}. Adicionalmente, o contato do álcool com a mucosa do trato intestinal resulta em alterações na sua morfologia e no processo de renovação celular, diminuindo a absorção de nutrientes⁷¹⁻⁷⁵. Esse problema absorptivo gera ainda mais repercussões, pois micronutrientes como, por exemplo, a vitamina A (retinóides), são importantes para o controle da diferenciação em diferentes tecidos epiteliais.

O consumo de álcool afeta o metabolismo da vitamina A em diferentes aspectos, incluindo sua absorção, degradação e distribuição⁷⁶, reduzindo seus níveis sanguíneos⁷⁷. Nas células epiteliais, álcool e vitamina A competem pelo mesmo receptor. Assim, na presença do álcool, a absorção de vitamina A pela célula e subsequente conversão em ácido retinóico, que é necessário para a diferenciação celular, vai se dar de forma inapropriada, o que explica a alteração da maturação epitelial encontrada na mucosa bucal de animais submetidos à ingestão de álcool^{43,44-46,78}.

O consumo crônico de álcool mostra relação com redução dos níveis de retinóides na cavidade bucal⁷⁹. Em experimentos com animais, a relação entre deficiência de vitamina A e câncer tem sido encontrada, assim como um aumento da suscetibilidade a carcinógenos químicos⁸⁰. Por outro lado, Mak *et al.*⁸¹, estudando a influência da ingestão do álcool e da deficiência de vitamina A na proliferação e na estrutura da mucosa do esôfago de ratos, mostraram que seus efeitos são independentes. A deficiência de vitamina A, independentemente da ação do álcool, produziu diminuição do número de células na camada basal e aumento dos grânulos de cerato-hialina, denotando alteração no padrão de maturação celular. Nos animais que receberam álcool, houve um aumento da proliferação celular no epitélio da mucosa esofágica, na presença ou ausência da vitamina A. A partir desses resultados, concluíram que o álcool ou seus metabólitos exercem efeito direto na proliferação celular do esôfago, e que o álcool seria um fator de risco para o câncer, enquanto que a deficiência de vitamina A provocaria apenas distúrbios de maturação epitelial.

Rennie *et al.*⁸² e Scott *et al.*⁸³ mostraram que, isoladamente, a má nutrição é capaz de provocar atrofia da mucosa bucal, tornando o indivíduo mais suscetível à ação de agentes externos, como antígenos, carcinógenos e produtos bacterianos. Mais uma vez observa-se a superposição dos efeitos diretos e indiretos do consumo de etanol sobre a mucosa, reforçando a característica multifatorial dessa relação.

O metabolismo do álcool produz elementos instáveis

chamados radicais livres (RL), principalmente quando a P450 2E1 é utilizada como rota de degradação^{28,84-86}. O organismo tem mecanismos de defesa para neutralizar esses RL gerados, conhecidos como mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. RL que não são neutralizados pelos mecanismos antioxidantes podem reagir com proteínas, lipídios ou mesmo com o DNA, formando complexos e danificando-os^{55,86,87}. Como estas ligações são estáveis, diferentes funções celulares podem ser perturbadas como, por exemplo, o transporte intracelular e a síntese proteica.

Adicionalmente, o consumo de álcool modifica a capacidade antioxidante do organismo, reduzindo tanto a atividade dos mecanismos enzimáticos como a dos não-enzimáticos, levando ao estado de desequilíbrio chamado estresse oxidativo.

As vitaminas A, C e E, que fazem parte dos mecanismos não-enzimáticos, têm seus níveis reduzidos pela baixa ingestão, má absorção e disponibilização deficiente a partir do fígado⁸⁸. Outros trabalhos utilizaram administração intragástrica de álcool em ratos e camundongos, encontrando diminuição da atividade de uma das principais enzimas antioxidantes (SOD-superóxido-dismutase) nas células hepáticas⁸⁹.

Alguns estudos têm mostrado uma forte relação entre estresse oxidativo e danos causados pelo álcool. Alguns autores mostram que, frente ao aumento da capacidade antioxidante do organismo, observa-se uma atenuação ou reversão dos danos provocados pelo consumo de álcool. Zhou *et al.*⁹⁰ verificaram que em camundongos, nos quais se induziu uma superexpressão de metalotioneína, um potente antioxidante, houve uma prevenção nos danos hepáticos observados frente ao consumo de álcool. Vincon *et al.*⁹¹ demonstraram que o aumento de proliferação celular observado no epitélio intestinal de camundongos que consumiam álcool foi revertido quando lhes era administrada vitamina E. Esses achados não só sugerem que o aumento da proliferação celular pode ser uma resposta à presença de RL não neutralizados, mas também que o dano provocado pode ser reversível.

Outros estudos submetem animais à ação de carcinógenos na presença e ausência de vitamina E, sendo que a ocorrência de carcinomas espinocelulares e de displasias epiteliais na mucosa bucal foi menor quando da exposição concomitante à vitamina E⁹². Esses achados abrem uma nova perspectiva, indicando que o estresse oxidativo pode ser o principal mecanismo envolvido no dano gerado pelo consumo de álcool. Entretanto, como ainda não foram realizados estudos em que essa hipótese pudesse ser testada na mucosa bucal, esta consideração permanece como uma especulação.

O consumo de álcool poderia ainda afetar a mucosa bucal indiretamente pela alteração das glândulas salivares. A morfologia e a função dessas estruturas

encontram-se alteradas em decorrência da ingestão crônica de álcool, o que inclui aumento de volume das glândulas em função de uma fibrose e infiltração gordurosa^{83,93-95}, bem como diminuição do fluxo salivar^{95,96}. Segundo Wu-Wang *et al.*⁹⁷, isso se deve ao fato de o álcool provocar uma diminuição das prostaglandinas PG2, PGF2 e 6-keto-PGF1, que normalmente atuam estimulando o fluxo salivar.

Essa redução poderia potencializar o estresse oxidativo, já que a saliva apresenta imunoglobulinas, fatores de crescimento e antioxidantes que são importantes na proteção e na manutenção da homeostase da mucosa bucal⁹⁸⁻⁹⁹. Além disso, com a redução do fluxo salivar, haveria um prejuízo na ação de "lavagem" das superfícies das mucosas, deixando-as mais expostas à ação de carcinógenos que, eventualmente, estariam presentes na boca. Ademais, ao utilizar a água proveniente do sangue na produção de saliva, poderia haver a redistribuição do álcool ou o acetaldeído para a cavidade bucal, aumentando ainda mais os seus efeitos já discutidos anteriormente. O fato de o aumento da proliferação epitelial das mucosas desaparecer frente à remoção das glândulas salivares reforça essa hipótese⁹⁵.

CONCLUSÕES

Apesar de o consumo de álcool poder influenciar a mucosa bucal por meio de diferentes mecanismos, ainda não está claro na literatura até que ponto o álcool isoladamente pode ser responsável pelo desenvolvimento de câncer de boca. Mesmo que uma possível explicação para o aumento de risco de desenvolvimento de carcinomas espinocelulares de boca em indivíduos expostos ao álcool e ao tabaco seja dada pelos estudos de permeabilidade, ainda há dúvidas sobre o quanto cada um dos possíveis mecanismos envolvidos pode contribuir. Esse tema é bastante complexo, pois esses mecanismos se inter-relacionam, sendo difícil estabelecer o real impacto de cada um deles. Há necessidade de mais estudos para esclarecer esses mecanismos, especialmente em relação ao polimorfismo genético das enzimas de degradação e ao papel do estresse oxidativo no mecanismo de dano relacionado ao álcool.

Potencial Conflito de Interesses:

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer o apoio prestado pela Bibliotecária Malvina Vianna Rosa, da Faculdade de Odontologia, na busca dos artigos científicos e pela acadêmica Marina Mendez.

REFERÊNCIAS

- Almeida-Filho N, Lessa I, Magalhaes L, Araújo MJ, Aquino E, James SA, et al. Alcohol drinking patterns by gender, ethnicity, and social class in Bahia, Brazil. *Rev Saúde Pública*. 2004;38(1):45-54.
- Ferigolo M, Barbosa FS, Arbo E, Malysz AS, Stein AT, Barros HM. Drug use prevalence at FEBEM, Porto Alegre. *Rev Bras Psiquiatr*. 2004;26(1):10-16.
- Wynder EL, Bross IJ, Feldman RM. A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer*. 1957;10(6):1300-323.
- La Vecchia C, De Carli A, Mezzanotte G, Cislaghi C. Mortality from alcohol related disease in Italy. *J Epidemiol Community Health*. 1986;40(3):257-61.
- Leclerc A, Brugere J, Luce D, Point D, Guenel P. Type of alcoholic beverage and cancer of the upper respiratory and digestive tract. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1987;23(5):529-34.
- Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: A case-control study. *Int J Cancer*. 1989;43(6):992-1000.
- Fioretti F, Bosetti C, Tavani A, Franceschi S, La Vecchia C. Risk factor for oral pharyngeal cancer in never smokers. *Oral Oncol*. 1999;35(4):375-78.
- De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Fierro L, Mendilaharsu M. Hard liquor drinking is associated with higher risk of cancer of the oral cavity and pharynx than wine drinking. A case-control study in Uruguay. *Oral Oncol*. 1998;34(2):99-104.
- Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. *J Oral Pathol Med*. 2004;33(9):525-32.
- Wynder EL, Mushinski MH, Spivak JC. Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers. *Cancer*. 1977;40(4 suppl):1872-878.
- Mashberg A, Garfinkel L, Harris S. Alcohol as a primary risk factor in oral squamous carcinoma. *CA Cancer J Clin*. 1981;31(3):146-55.
- Rothman KJ. Epidemiology of head and neck cancer. *Laryngoscope*. 1978;88(3):435-38.
- Rich AM, Radden BG. Squamous cell carcinoma of the oral mucosa: a review of 244 cases in Australia. *J Oral Pathol*. 1984;13(5):459-71.
- Franceschi S, Talamini R, Barra S, Baron AE, Negri E, Bidoli E, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in Northern Italy. *Cancer Res*. 1990;50(20):6502-507.
- Brugere J, Guenel P, Leclerc A, Rodriguez J. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth. *Cancer*. 1986;57(2):391-95.
- Kabat GC, Wynder EL. Type of alcoholic beverage and oral cancer. *Int J Cancer*. 1989;43(2):190-94.

17. Keller AZ, Terris M. The association of alcohol and tobacco with cancer of the mouth and pharynx. *Am J Public Health.* 1965;55(10):1578-585.
18. Kato I, Nomura AM. Alcohol in the etiology of upper aerodigestive tract cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1994;30B(2):75-81.
19. Kissin B, Kaley MM, Su WH, Lerner R. Head and neck cancer in alcoholics. The relationship to drinking, smoking and dietary patterns. *JAMA.* 1973;224(8):1174-175.
20. Ogden GR, Wight AJ. Aetiology of oral cancer: alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1998;36(4):247-51.
21. Ogden GR, Wight AJ, Rice P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med.* 1999;28(5):216-20.
22. Squier CA, Cox P, Hall BK. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J Oral Pathol.* 1986;15(5):276-79.
23. Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Penetration of N-nitrosomicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med.* 2000;29(2):80-85.
24. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis.* 2001;7(6):349-54.
25. Squier CA, Wertz PW. Structure and function of the oral mucosa and implications for drug delivery. In: Rathbone MJ (ed). *Oral mucosa drug delivery.* New York: Marcel Dekker; 1996:1-26.
26. Squier CA, Finkelstein MW. Mucosa bucal. In: Ten Cate AR. *Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função.* 5a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001:323-39.
27. Dong YJ, Peng TK, Yin SJ. Expression and activities of class IV alcohol dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase in human mouth. *Alcohol.* 1996;13(3):257-62.
28. Maher JJ. Exploring alcohol's effects on liver function. *Alcohol Health Res World.* 1997;21(1):5-12.
29. Bird RP, Draper HH, Badsur PK. Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells. Production of micronuclei and chromosomal aberrations. *Mutat Res.* 1982;101(3):237-46.
30. Dellarco VL. A mutagenicity assessment of acetaldehyde. *Mutat Res.* 1988;195(1):1-20.
31. Ramchandani VA, Bosron WF, Li TK. Research advances in ethanol metabolism. *Pathol Biol.* 2001;49(9):676-82.
32. Harty LC, Corporaso NE, Hayes RB, Winn DM, Bravo-Otero E, Blot WJ, et al. Alcohol dehydrogenase-3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(22):1698-705.
33. Yin SJ, Chou FJ, Chao SF, Tsai SF, Liao CS, Wang CW, et al. Alcohol and aldehyde dehydrogenases in human esophagus. Comparison with the stomach enzyme activity. *Alcohol Clin Exp Res.* 1993;17(2):376-82.
34. Yokohama A, Muramatsu T, Ohmori T, Higuchi S, Hayashida M, Ishii H. Esophageal cancer aldehyde-dehydrogenase-2 genotypes in Japanese males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1996;5(2):99-102.
35. Väkeväinen S, Tillonen J, Agarwal DP, Srivastava N, Salaspuro M. High salivary acetaldehyde after a moderate dose of alcohol in ALDH2-deficient subjects: strong evidence for the local carcinogenic action of acetaldehyde. *Alcohol Clin Exp Res.* 2000;24(6):873-77.
36. Mumenthaler MS, Taylor JL, O'Hara R, Yesavage JA. Gender differences in moderate drinking effects. *Alcohol Res Health.* 1999;23(1):55-64.
37. Homann N, Karkkainen P, Koivisto T, Nosova T, Jokelainen K, Salaspuro M. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(22):1692-697.
38. Homann N, Tillonen J, Rintamaki H, Salaspuro M, Lindqvist C. Poor dental status increases acetaldehyde production from ethanol in saliva a possible link to increased oral cancer risk among heavy drinkers. *Oral Oncol.* 2001;37(2):153-58.
39. Tilonem J, Homann N, Rautio M, Jousimies-Somer H, Salaspuro M. Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-associated oral cavity cancer. *Alcohol Clin Exp Res.* 1999;23(8):1409-415.
40. Muto M, Hitomi Y, Ohtsu A, Shimada H, Kashiwase Y, Sasaki H, et al. Acetaldehyde production by non-pathogenic Neisseria in human oral microflora: implications for carcinogenesis in upper aerodigestive tract. *Int J Cancer.* 2000;88(3):342-50.
41. Smith EM. Epidemiology of oral and pharyngeal cancers in the United States: review of recent literature. *J Natl Cancer Inst.* 1979;63(5):1189-198.
42. Elwood JM, Pearson JC, Skippen DH, Jackson SM. Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *Int J Cancer.* 1984;34(5):603-12.
43. Maier H, Weidauer H, Zoller J, Seitz HK, Flentje M, Mall G, et al. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994;18(2):387-97.
44. Mascres C, Joly JG. Histochemical and ultrastructural study of the rat oral mucosa, after chronic administration of alcohol. *J Biol Buccale.* 1981;9(3):279-95.
45. Valentine JA, Scott J, West CR, St Hill CA. A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. *J Oral Pathol.* 1985;14(8):654-65.
46. Sanfelice JC, Padilha DMP, Sant'Ana Filho M. Morphological changes in epithelium of the tongue of mice exposed to 40° GL alcohol solution. *Rev Fac Odontol de Porto Alegre.* 2003;44(1):3-14.

47. Larentis CL, Gedoz L, Maito FDM, Sanfelice J, Sant'Ana Filho M, Rados PV. Avaliação citopatológica da mucosa bucal de camundongos fêmeas submetidos ao consumo e aplicação tópica de álcool. Resumos do XII Salão e IX Feira de Iniciação Científica da UFRGS; 2000, realizada de 11 a 15 de setembro 2000 em Porto Alegre (RS). Resumos. Porto Alegre: UFRGS; 2000: 325.
48. Martinez M, Martinez FE, Cunha MR, Segatelli TM, Pinheiro PF, Almeida CC. Morphological effects on the hard palatine mucosa of *Calomys callosus* submitted to experimental chronic alcoholism. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2000;34(1):77-83.
49. Martinez M, Martinez FE, Watanabe I. Morphological changes on the hard palatine mucosa of rats (*Rattus Norvegicus Albinus*) after chronic alcohol consumption. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1998;30(3):379-84.
50. Maito FDM, Rados PV, Filho MS, Barbachan, JJ, Quadros O. Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of or topical exposure to alcohol. *Alcohol.* 2003;31(1-2):25-30.
51. Carrard VC, Filho MS, Rados PV, Chaves AC, Lauxen Ida S. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of alcohol. *Alcohol.* 2004;34(2-3):233-38.
52. Slomiany BL, Piotrowski J, Piotrowski E, Slomiany A. Induction of buccal mucosal apoptosis with chronic alcohol ingestion. *Biochem Mol Biol Int.* 1998;44(2):381-89.
53. Pöschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol.* 2004;39(3):155-65.
54. Garro AJ, Seitz HK, Lieber CS. Enhancement of dimethylnitrosamine metabolism and activation to a mutagen following chronic ethanol consumption. *Cancer Res.* 1981;41(1):120-24.
55. Espina N, Lima V, Lieber CS, Garro AJ. In vitro and in vivo inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O6-methylguanine transferase. *Carcinogenesis.* 1988;9(5):761-66.
56. Mufti SI, Salvagnini M, Lieber CS, Garro AJ. Chronic ethanol consumption inhibits repair of dimethylnitrosamine-induced DNA alkylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;152(1):423-31.
57. Hsu TC, Furlong C. The role of ethanol in oncogenesis of the upper aerodigestive tract; inhibition of DNA repair. *Anticancer Res.* 1991;11(6):1995-998.
58. Riveros-Rosas H, Julian-Sanchez A, Piña E. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch Med Res.* 1997;28(4):453-71.
59. Rubin E, Lieber CS. Hepatic microsomal enzymes in man and rat, induction and inhibition by ethanol. *Science.* 1968;162(854):690-91.
60. Miller JA. Carcinogenesis by chemicals: an overview - G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* 1970;30(3):559-76.
61. Garro AJ, Espina N, Farinati F, Salvagnini M. The effects of chronic ethanol consumption on carcinogen metabolism and on O6-methylguanine transferase-mediated repair of alkylated DNA. *Alcohol Clin Exp Res.* 1986;10(6 suppl):73S-77S.
62. Protzel M, Giardina AC, Albino EH. The effect of liver imbalance on the development of oral tumors in mice following the application of benzpyrene or tobacco tar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1964;18(5):622-35.
63. Lieber CS. Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissue. *N Engl J Med.* 1988;319(25):1639-650.
64. Johnson PJ. Acute and chronic liver disease. In: Marshall WJ, Bangert SK (eds). *Clinical biochemistry: metabolic and clinical aspects.* New York: Churchill Livingstone; 1995:243-45.
65. Szabo G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol.* 1999;34(6):830-41.
66. Lundy J, Raaf JH, Deakins S, Wanebo HJ, Jacobs DA, Lee T, et al. The acute and chronic effects of alcohol on the human immune system. *Surg Gynecol Obstet.* 1975;141(2):212-18.
67. Gallucci RM, Pfister LJ, Meadows GG. Effects of ethanol consumption on enriched natural killer cells from C57B/6 mice. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994;18(3):625-31.
68. Wang HF, Spitzer JJ. Alcohol-induced thymocyte apoptosis is accompanied by impaired mitochondrial function. *Alcohol.* 1997;14(1):99-105.
69. Deleyiannis FW, Thomas DB, Vaughan TL, Davis S. Alcoholism: independent predictor of survival in patients with head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(8):542-49.
70. Seitz HK, Simanowski UA. Alcohol and carcinogenesis. *Annu Rev Nutr.* 1988;8:99-119.
71. Maio R, Dichi JB, Burini RC. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes. *Arq Gastroenterol.* 2000;37(2):120-24.
72. Baraona E, Pirola RC, Lieber CS. Acute and chronic effects of ethanol on intestinal lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1975;388(1):19-28.
73. Zucoloto S, Rossi MA. Effect of chronic ethanol consumption on mucosal morphology and mitotic index in the rat small intestine. *Digestión.* 1979;19(5):277-83.
74. Simanowski UA, Seitz HK, Baier B, Kommerell B, Shmidt-Gayk H, Wright NA. Chronic ethanol consumption selectively stimulates rectal cell proliferation in the rat. *Gut.* 1986;27(3):278-82.
75. Tarnawski A, Lu SY, Stachura J, Sarfeh IJ. Adaptation of gastric mucosa to chronic alcohol administration is associated with increased mucosal expression of growth factors and their receptor. *Scand J Gastroenterol.* 1990;193(27):59-63.
76. Leo MA, Lieber CS. Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. *Am J Clin Nutr.* 1999;69(6):1071-1085.

77. Brunt PW, O'Donnell McGhee J. Chronic alcohol abuse: other systems. *Medicine*. 1995;23:66-68.
78. Figuero Ruiz E, Carretero Pelaez MA, Cerero Lapedra R, Esparza Gomez G, Moreno Lopez LA. Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. *Med Oral*. 2004;9(1):14-23.
79. Seitz H, Matsuzaki S, Yokoyama A, Omán N, Vakevanen S, Wang XD. Alcohol and cancer. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001;25(5):137-43.
80. Contreras EG. Retinoides: su aplicación en las lesiones precancerosas y el cáncer oral. *Med Oral*. 2001;6:114-23.
81. Mak KM, Leo MA, Lieber CS. Effect of ethanol and vitamin A deficiency on epithelial cell proliferation and structure in the rat esophagus. *Gastroenterology*. 1987;93(2):362-70.
82. Rennie JS, McDonald DG, Dagg JH. Quantitative analysis of human buccal epithelium in iron deficiency anaemia. *J Oral Pathol*. 1982;11(1):39-46.
83. Scott J, Valentine JA, St Hill CA, West CR. Morphometric analysis of atrophic changes in human lingual epithelium in iron deficiency anaemia. *J Clin Pathol*. 1985;38(9):1025-1029.
84. Navasumrit P, Ward TH, Dodd NJ, O'Connor PJ. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis*. 2000;21(1):93-99.
85. Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology*. 2002;35(1):62-73.
86. McDonough KH. Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology*. 2003;189(1-2):89-97.
87. Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health*. 2003;27(4):277-84.
88. Thomson AD. Alcohol and nutrition. *Clin Endocrinol Metab*. 1978;7(2):405-28.
89. Polavarapu R, Spitz DR, Sim JE, Follansbee MH, Oberley LW, Rahemtulla A, et al. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology*. 1998;27(5):1317-323.
90. Zhou Z, San X, Kang YJ. Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stress. *Exp Biol Med*. 2002;227(3):214-22.
91. Vincon P, Wunderer J, Simanowski UA, Koll M, Preedy VR, Peters TJ, et al. Inhibition of alcohol-associated colonic hyperregeneration by α -tocopherol in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003;27(1):100-106.
92. Schwartz J, Baker V, Larios E, Desai D, Amin S. Inhibition of experimental tobacco carcinogen induced head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2004;40(6):611-23.
93. Borsanyi S, Blanchard C. Asymptomatic enlargement of the parotid glands in alcoholic cirrhosis. *Southern Med J*. 1961;54:678.
94. Mandel L, Baurmash H. Parotid enlargement due to alcoholism. *J Am Dent Assoc*. 1971;82(2):369-73.
95. Maier H, Born I, Veith S, Adler D, Seitz HK. The effect of chronic ethanol consumption on salivary gland morphology and function in the rat. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986;10(4):425-27.
96. Enberg N, Alho H, Loimaranta V, Lenander-Lumikari M. Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92(3):292-98.
97. Wu-Wang CY, Lim C, Slomiany A, Slomiany BL. Impairment by ethanol of prostaglandin production in rat salivary glands. *Arch Oral Biol*. 1991;36(1):9-13.
98. Mandel ID. The functions of saliva. *J Dent Res*. 1987;66:623-27.
99. Battino M, Ferreiro MS, Gallardo I, Newman HN, Bullon P. The antioxidant capacity of saliva. *J Clin Periodontol*. 2002;29(3):189-94.

Abstract

Alcohol consumption is a risk factor for the development of oral cancer, but the mechanisms involved in the damage caused by alcohol consumption are only partially understood. Certain alcohol levels cause an increase in the permeability of the oral mucosa, facilitating the penetration of carcinogens. Alcohol also increases epithelial proliferation and modifies the epithelial maturation process. Other alterations such as reduced capacity for DNA repair and disorders of the immune system and nutritional status can contribute to the development of oral cancer. Alcohol metabolism increases the production of free radicals and decreases anti-oxidative mechanisms, leading to oxidative stress. Gene polymorphism in the genes involved in alcohol catabolism may account for the difference in individual sensitivity. Some isoforms of these enzymes allow the accumulation of toxic metabolites like acetaldehyde, which damage DNA and other cell structures. Based on a literature review, the current article aims to establish a relationship between the various mechanisms involved in the effect of alcohol and carcinogenesis in the oral cavity.

Key words: Ethanol, Squamous cell carcinoma, Oral mucosa

Effects of acute alcohol consumption and vitamin E co-treatment upon oxidative stress parameters in rats tongue.

(Manuscrito submetido ao periódico Food and Chemical Toxicology – Em fase de respostas aos revisores)

Carrard V. C.^{a,b*}, Pires A. S.^{a,b}, Mendez M.^a, Mattos F.^a, Moreira J.C. F.^b and Sant'Ana Filho M.^a

^a *Laboratório de Histopatologia Prof. Dr. J. J. Barbachan (Patologia Bucal), Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.*

^b *Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil.*

* Corresponding author: Vinicius C. Carrard (vcarrard@yahoo.com.br)

Rua Ramiro Barcelos, 2492/503, Porto Alegre, RS, Brasil CEP:90035-003.

Tel.: +55-51-3308.5011; fax: +55-51-3308.5023.

Keywords: *ethanol, alfa-tocopherol, free radicals, oral mucosa, oxidative stress*

Abbreviations: CAT, catalase activity; DNPH, dinitrophenylhydrazine; LSD, least significant difference; ROS, reactive oxygen substances; SOD, superoxide dismutase activity; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances;

Effects of acute alcohol consumption and vitamin E co-treatment on oxidative stress parameters in rats tongue.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of acute alcohol consumption and vitamin E co-treatment upon oxidative stress parameters in rats tongue. Thirty-eight, *Wistar* rats were separated into five groups (alcohol, alcohol/vitamin E, control, tween, vitamin E). Alcohol and Alcohol Vitamin E groups had the standard diet, and 40% alcohol on drinking water. Other groups were fed with the same standard diet and water ad libitum. Vitamin E was given by gavage to Vitamin E and Alcohol/Vitamin E rats twice a week. Alcohol and Control groups were subjected to saline gavage and Tween group to 5% tween 80 solution, the vitamin E vehicle. At day 14, the animals were anesthetized and specimens were obtained from tongue. Lipid peroxidation (TBARS), protein oxidative damage, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities were quantified. Alcohol group decreased TBARS in relation to Control group and alcohol vitamin-treated animals decreased TBARS when compared to Tween and Vitamin E groups. SOD activity was lower and CAT activity was higher in animals treated with both alcohol and vitamin E. These results suggest that short-term alcohol consumption decreases lipid peroxidation levels. Alternatively, Alcohol/Vitamin E group increased CAT, showing the toxicity of this association.

Introduction

Oxidative stress has been suggested as playing a central role in many pathways of alcohol-induced damage in a variety of systems, such as liver (Dey and Cederbaum, 2006), central nervous system (Nordman, 1987; Chu et al, 2007) and testes (Nordman et al, 1990). Alcohol metabolism generates reactive oxygen species (ROS), which may damage macromolecules in the cell, including lipids, proteins and DNA (McDonough, 2003; Wu, Cederbaum, 2003; Das, Vasudevan, 2007).

It has been demonstrated that both acute and chronic alcohol exposure increase ROS production and decrease antioxidant defenses leading to oxidative stress in liver (Halliwell, 1991; Wu and Cederbaum, 2003). Antioxidant enzymes exhibit reduced activity in addition to decreases in the cellular and extracellular content of non-enzymatic antioxidants that should be obtained by diet but are inadequately absorbed by the gastrointestinal system due to alcohol consumption (Wu and Cederbaum, 2003).

Few studies have assessed the short-term effects of alcohol on oral mucosa and has focused only on epithelial permeability (Du et al, 2000, Howie et al, 2001). Biochemical imbalance could be the first signal of alcohol damage.

Therefore, the aim of this study was to assess the acute alcohol intake effects and the possible protective effect of vitamin E co-administration upon oxidative stress parameters and antioxidant enzymes activities after acute alcohol exposure in rats tongue tissues.

Materials and methods

Chemicals

Alcohol was purchased from Cromoline-Química Fina (Diadema, SP, Brazil). Thiobarbituric acid, Folin-Ciocalteu reagent, 1,1,3,3-tetramethoxypropane, Catalase, Adrenaline, Dinitrophenylhydrazine (DNPH) and vitamin E (α -tocopherol) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Glycine was purchased from Nuclear (Diadema, SP, Brazil). Tween 80 was purchased from Riedel-de-Haën (Seelze, Germany).

Animals and treatment

Thirty-eight, 3 months old female Wistar rats (*Rattus norvegicus*), weighing 190-260 g, were housed in a temperature-controlled room ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) with 12:12 h reverse light/dark cycle. This experiment was approved by the Research Committee and the Ethics Committee at the Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol no. 190/05 of Dentistry Graduate Program).

All animals used in the experiments were treated in accordance with The *Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals* prepared by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health.

Animals were assigned to one of the following five groups by the stratified weight randomization method:

- 1) Control, n=6;
- 2) Alcohol, n=10;
- 3) Tween 80 (Vitamin E solvent), n=6;

4) Vitamin E + Tween 80, n=6;

5) Alcohol/Vitamin E, n=10.

The Control, Tween and Vitamin E groups were fed a standard laboratory chow diet for rodents (Nuvilab/CR1, Nuvital Nutrientes LTDA, Colombo, Brazil) and tap water ad libitum. The other experimental groups (Alcohol and Alcohol/Vitamin E) received the same standard diet but the water was replaced with 40% (vol./vol.) ethyl alcohol throughout experiment, which was available ad libitum as well. The 40% alcohol concentration was chosen because it is the same concentration found in “cachaça”, a distilled liquor most frequently consumed by the Brazilian population (Neves et al, 1989). During the first week, the alcohol concentration was increased gradually from 5% to 40%, according to the Table 1 (adapted from McMillen et al, 2005):

<Insert Table 1 here>

Vitamin E (α -tocopherol dissolved in 5% tween 80 solution) was given orally via gavage (200 mg/kg, twice a week according to Kalender et al (2004) to Alcohol/Vitamin E and Vitamin E rats. Alcohol and Control groups were subjected to saline gavage. Tween treated animals received 5% tween 80 (Krishnamuethy and Bieri, 1963) solution at the same dose as Alcohol/Vitamin E and Vitamin E animals with the aim to evaluate the effect of the vitamin E vehicle.

The solutions volume (ml) and standard chow diet amount (g) consumption were monitored along study. Animals weight (g) was measured at the beginning and at the end of the experiment, as well as the weight gain (%) during to study was measured.

At day 14, under intra-peritoneal anesthesia using 100 mg/kg ketamine/50 mg/kg xylazine, a specimen was obtained from tongue dorsum by 5-mm biopsy punch, which includes epithelial and connective tissues. This anatomic site was chosen in order to standardize the location and size of the specimen. The tongue biopsy was homogenized in ice-cold phosphate saline buffer (PBS, pH 7.4), sonicated in ice bath (4 cycles of 10s) and stored at -80°C for further analyses. It was assessed the Lipid peroxidation (thiobarbituric acid-reactive substances-TBARS), protein oxidative damage (carbonyl groups), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities.

Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)

As an index of lipid peroxidation we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction (Valenzuela, 1991). Briefly, 300 μL of sample was mixed with 600 μL of trichloroacetic acid 15% and 500 μL of thiobarbituric acid 0.67%, then heated in a boiling water bath for 20 min. TBARS were determined by absorbance at 532 nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as an external standard. Results were expressed as malondialdehyde equivalents per milligram of protein.

Protein carbonyls

Oxidative damage to protein was assessed by determination of carbonyl groups based on their reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as described by Levine et al (1990). Briefly, proteins were precipitated by the addition of 20% trichloroacetic acid to 150 μL of concentrated sample and reacted with DNPH. Then 8M urea was added to samples and the carbonyl content was determined from absorbance at 370 nm using a molar absorption coefficient of $22,000\text{ M}^{-1}$. Urea was used instead of guanidine hydrochloride due to higher cost of the former.

Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities

In order to determine CAT activity, tissue samples were sonicated in 50 mM phosphate buffer and the resulting suspension was centrifuged at 6200 x g for 10 min. The supernatant was used for enzyme assay. CAT activity was measured by the rate of decrease in hydrogen peroxide (10mM) absorbance at 240 nm (Aebi, 1984). SOD activity was quantified by inhibition of adrenaline self-oxidation absorbance at 480nm and the tissue samples were not sonicated for this assay (Misra and Fridovich, 1987).

Protein quantification

All of the results were normalized for protein content (Lowry et al, 1951).

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used to compare means between groups when data followed normal distribution. Statistical significance was considered when $p < 0.05$. The Tukey test was performed for multiple comparison.

Results

Nutritional parameters

The alcohol treated animals consumed a lower solution volume when compared to Control, Tween and Vitamin E groups. The same behavior was observed in relation to standard chow diet consumption (Table 2).

<Insert Table 2 here>

Animals weight did no differ from each other at the beginning of experiment ($p=0.91$), but at the end, the alcohol treated animals' weight were lower (Table 3, $p<0.05$).

<Insert Table 3 here>

Lipid peroxidation and protein oxidative damage

Lipid peroxidation levels (TBARS) and protein carbonyls are shown in Figures 1a and 1b. Rats subjected to alcohol treatment exhibited lower TBARS levels when compared to Control, Tween and Vitamin E groups (Fig 1a, control= 0.130 ± 0.017 , alcohol= 0.084 ± 0.036 , tween= 0.148 ± 0.013 , vitamin E= 0.160 ± 0.015 , alcohol/vitamin E= 0.108 ± 0.031 , $p<0.05$). In addition, alcohol intake associated with vitamin E co-treatment showed lower TBARS levels when compared to vitamin E-treated animals. Protein carbonyls were not significantly different between groups ($p=.554$).

<Insert Figure 1 here>

Superoxide dismutase and catalase activities

SOD and catalase activities are shown in Figures 2A and 2B respectively. SOD activity was higher in Tween group and lower in Alcohol/Vitamin E group when compared with other groups (tween = 18.49 ± 12.67 , vitamin E = 14.90 ± 5.30 , alcohol = 10.55 ± 4.44 , control = 8.74 ± 5.25 , alcohol/vitamin E = 6.58 ± 3.33 , $p<0.05$). CAT activity was higher in Alcohol/Vitamin E group when compared to Control and Vitamin

E groups (alcohol/vitamin E = 0.024 ± 0.006 , tween = 0.018 ± 0.006 , alcohol = 0.016 ± 0.006 , control = 0.014 ± 0.005 , vitamin E = 0.011 ± 0.007 , $p < 0.05$). SOD/CAT ratio are shown in Figure 2c. Alcohol/Vitamin E animals presented a lower SOD/CAT ratio when compared to Vitamin E ones (alcohol/vitamin E, mean rank = 6,57; vitamin E, mean rank = 20,67, $p < 0.05$).

<Insert Figure 2 here>

Discussion

This is the first time that acute alcohol effects upon rats tongue oxidative stress parameters were assessed in literature. It was observed a decreased lipid peroxidation level in alcohol-treated animals (Fig.1-a). Animals subjected to alcohol and vitamin E present a lipid peroxidation level lower than Vitamin E-treated animals (Fig.1-a), which reinforces our hypothesis that alcohol induced lipid peroxidation levels decrease. This result was in agreement with previous studies, where an alcohol antioxidant effect was observed in Sertoli cell cultures and kidney of rat tissues after low doses of alcohol administration (Dal-Pizzol et al, 2001; Bertelli et al, 2005, respectively). On the other hand, Comporti et al (1967), have demonstrated an increase in liver lipid peroxidation. These discrepancies in reported data are likely to be linked to differences in the tissues studied, as well as dose, concentration and route of alcohol administration (Nordmann et al, 1992). The differences in tissue responses to alcohol are complex and may vary according to the different tissues involved. The liver and kidney are certainly affected by alcohol ingestion earlier than oral mucosa, since they are the tissues more involved with alcohol metabolism and excretion respectively. The liver is the major site of alcohol metabolism. Liver alcohol oxidative damage has been well demonstrated in the literature (Lieber, 1988; Johnson, 1995). Free radical mechanisms also seem to be

implicated in the toxicity of alcohol to several extrahepatic tissues. Overall, the available data concern the gastric mucosa, the central nervous system, the heart, and the testes (Nordmann et al, 1992). In oral mucosa, there is lower amounts of alcohol degradation, so, at least after short-term alcohol administration, it is reasonable that alcohol effects was less conspicuous than liver. Therefore, there is a tissue-specific sensitivity; liver, the main site of alcohol metabolism, presents alcohol damage effects earlier (3 days) (Wang and Cederbaum, 2007). In the same way, tissues such as central nervous system has been showed to be more sensitive to alcohol damage (Nordman, 1987; Chu et al, 2007), because alcohol lead to an increased ROS generation and antioxidant capacity decrease (Nordman, 1987; Chu et al, 2007). Microsomal Ethanol Oxidazing System (MEOS) is an accessory pathway of alcohol metabolization, involving an enzyme called cytochrome P450 (CYP2E1) which is alcohol-inducible (Lieber, 1997). After chronic ethanol consumption, there is a 4- to 10-fold induction of CYP2E1, that may lead to ROS generation increase (Lieber, 1997). Antioxidant enzymes activity has been found in oral mucosa and in salivary glands (Yang et al, 2002; Campos et al, 2004), but there are no reports about oxidative stress parameters after alcohol consumption in literature. Our hypothesis was that vitamin E could improve antioxidant defenses as a non-enzymatic antioxidant (Fig. 3). Vitamin E supplementation method was based on Kalender et al (2004), who demonstrated its protective effects. We intend to use gavage and twice a week supplementation allow us to maintain vitamin E levels, since accumulation can occur on liver.

<Insert Figure 3 here>

Rat oral mucosa has a high degree of keratinization that possibly provides a relative level of protection when the animals are subjected to short-term exposure. The

keratinized layer of lingual epithelium show extremely flattened and dehydrated cells. It is possible that high alcohol concentrations improve this protective layer, as an effect described as “fixative” by Squier et al (1986) and Du et al (2000) that improve epithelium permeability barrier. Squier et al (2003) pointed that lipid metabolism alteration due to alcohol is related to permeability barrier impairment (Squier et al, 1986; Du et al, 2000). Those findings may be supported by lipid peroxidation reduction demonstrated in the present study (Fig. 1-a). These considerations may be reinforced by lipid granules accumulation observed in some studies as a consequence of 3 months of alcohol consumption (Mascrès and Joly, 1981; Martinez et al, 1998; Martinez et al, 2002). Squier et al (2003) suggested that these permeability barrier modifications are related to systemic effects of alcohol on liver metabolism. Since this findings were reported “in vitro” (Squier et al, 1986, Du et al, 2000) and “in vivo” studies (Howie et al, 2001; Squier et al, 2003), it may be speculated that alcohol influence lipid metabolism by association with local and systemic mechanisms. Previous studies carried out by our research group (Maito et al, 2003 and Carrard et al, 2004) have shown that, at least in mice, ethanol consumption induces increased cell proliferation in the epithelium of tongue dorsum. These findings support our hypothesis that biochemical alterations could take place after acute consumption and are the basis for our decision to investigate this particular anatomic site in the oral mucosa.

Vitamin E animals exhibited higher TBARS levels than Control (Fig. 1-a). This finding could be attributed to tween 80, the vehicle for vitamin E administration.

Higher SOD activity was observed in Tween and in Vitamin E groups when compared to Alcohol/Vitamin E (Fig.2.a), support the pro-oxidative effect attributed to tween 80, which induced SOD modulation. In addition, our results suggest that alcohol associated to vitamin E co-treatment plays a protective role against free radicals or ROS

produced by tween. The SOD modulation exhibited by Tween-treated animals was sufficient to scavenge free radicals or ROS, therefore no alteration was observed in lipid or protein oxidation parameters in this animals group (Fig.1.a and b).

Alcohol treatment produced no alterations in CAT activity (Fig.2.B). CAT activity increased in the Alcohol/Vitamin E group, when compared to the Control and Vitamin E animals. This could be a controversial finding since Alcohol/Vitamin E animals showed similar SOD activity when compared to Control group. However this finding could be the result of alcohol metabolism, since catalase is one of the alternative enzymes for alcohol metabolization. Therefore, this enzyme activity was probably stimulated by alcohol associated to vitamin E co-supplementation, in order to metabolize these substances. Since CAT activity increased in this group without a proportional increase in SOD activity, deleterious effects might be observed after longer treatment periods. This SOD/CAT imbalance may reduce the hydrogen peroxide level, which is important for cellular signaling in cellular proliferation and differentiation. However, in Vitamin E group we observed an increase the SOD/CAT ratio (Fig. 2.c.). It may be assumed that this alteration relates to increased hydrogen peroxide levels, resulting in the higher lipid peroxidation levels observed in these animals (Fig 1.a.).

Long-term alcohol intake experiments could change the oxidative damage parameters as well as antioxidant enzyme activity, improving the effects of different treatments. The SOD/CAT activity imbalance (Fig 2.c.) could have disturbed hydrogen-peroxide mediated cellular signaling in Alcohol/Vitamin E group and superoxide-mediated signaling in Tween group.

Although some authors consider tween 80 to be a suitable vehicle for the preparation of vitamin E solution (Krishnamurthy and Bieri, 1963; Ribeiro et al, 2005, Ohta et al, 2006), the pro-oxidant effect observed in our results demonstrates that it is

inappropriate. In future studies, vitamin E should be dissolved in another vehicle, such as corn oil. Alternatively, a lower concentration of tween solution, such as 0,01% could be employed (Campos et al, 2004). In this study, tween 80 was chosen because it allows for a water-soluble preparation, which was suitable in order to improve gastrointestinal absorption. Unfortunately, since tween exhibited a pro-oxidant effect, the antioxidant effect of vitamin E observed in other studies (Ilavazhagan et al, 2001) could not be properly evaluated in this study. Although Kalender et al (2004) have demonstrated protective effects with the doses employed in the present study (200mg/kg), it possible that oral tissues require higher doses for vitamin E to confer protective effects.

In summary, several studies have pointed out that alcohol, when administered both acutely and on a chronic basis, causes oxidative stress to most tissues including the liver (Hoek and Pastorino, 2002; Lieber, 2004), central nervous system (Goodlet and Horn, 2001), skeletal muscle (Mansouri et al, 2001; Adachi et al, 2006) and testes (Grattagliano et al, 1997; Schlorff et al, 1999).

Our alcohol-exposure experimental groups exhibited signals of malnutrition (Table 3), observed by impaired weight gain over two weeks. These could be explained by lower standard diet intake (Table 2), which is a behavior often related to in animals as well as in humans that consume alcohol (Seitz and Simanowski, 1988).

Our alcohol administration method somehow reproduced these aspects of alcoholism. Alcohol treated animals had lower weight gain (Table 3) and present a consequent lower weight at the end of experimental period (Table 3) that may be attributed to lower chow diet intake. The lower alcohol solution consumption could be explained by alcohol unpleasant taste. Diarrhea absence could discard the dehydration possibility.

Conclusion

The results of this study suggest that short-term alcohol intake modify the cellular lipid metabolism. Long period of alcohol administration should be conducted in order to asses the chronic effects on rat tongue mucosa. Simultaneous treatment with alcohol and vitamin E induced a higher catalase activity and no oxidative damage was observed. The protective effect of Vitamin E against ROS that could be expected (Fig. 3) was not observed, probably because the vehicle used (tween 80) exhibited an unknown pro-oxidant effects, even though the literature suggested that tween 80 was a good vehicle for vitamin E.

Acknowledgements

This study was conducted with the support of a grant received from CAPES (Brazilian Agency for the Improvement of Higher Education Personnel) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development). The authors would like to thank to Laboratório de Histopatologia Prof. Dr. J. J. Barbachan (Patologia Bucal), to the Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (Laboratório 32) at the Departamento de Bioquímica, UFRGS, as well as Dr. Caren Bavaresco, Patrícia Sesterheim, Luiza Braga, Isabel da Silva Lauxen, Dr. Cristiano Susin Luciana Adolfo, Leandro Nunes, Adriana Aguiar and Christiane Gerhard for technical support and Marcos Schwengber for assistance with surgical procedures.

References

Adachi J, Kudo R, Asano M, Ueno Y, Hunter R, Rajendram R et al. Skeletal muscle and liver oxysterols during fasting and alcohol exposure. *Metabolism*. 2006; 55(1):119-127.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105: 121-6.

Bertelli AA, Migliori M, Filippi C, Gagliano N, Donetti E, Panichi V et al. Effect of ethanol and red wine on ochratoxin A-induced experimental acute nephrotoxicity. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(17): 6924-9.

Campos SC, Moreira DA, Nunes TD, Colepicolo P, Brigagão MR. Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis. *Arch Oral Biol.* 2005; 50(7): 661-8.

Carrard VC, Filho MS, Rados PV, Chaves AC, Lauxen Ida S. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. *Alcohol.* 2004;34(2-3):233-8.

Chu J, Tong M, de la Monte SM. Chronic ethanol exposure causes mitochondrial dysfunction and oxidative stress in immature central nervous system neurons. *Acta Neuropathol.* 2007; 113: 659-673.

Comporti M, Hartman A, Di Luzio NR. Effect on in vivo and in vitro ethanol administration on liver lipid peroxidation. *Lab Invest.* 1967;16(4):616-624.

Dal-Pizzol F, Klamt F, Dalmolin RJ, Bernard EA, Moreira JC. Mitogenic signaling mediated by oxidants in retinol treated Sertoli cells. *Free Rad Res.* 2001;35(6):749-755.

Das SK, Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences*. 2007; 81: 177-187.

Dey A, Cederbaum AI. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology*. 2006;43 (2 suppl 1): S63-74

Dicker E, Cederbaum AI. Generation of reactive oxygen species and reduction of ferric chelates by microsomes in the presence of a reconstituted system containing ethanol, NAD⁺ and alcohol dehydrogenase. *Alcohol Clin Exp Res*. 1990;14(2):238-244.

Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med*. 2000;29(2):80-5.

Farin FM, Bigler LG, Oda D, McDougall JK, Omiecinski CJ. Expression of cytochrome P450 and microsomal epoxide in cervical and oral epithelial cells immortalized by human papillomavirus type 16 E6/E7 genes. *Carcinogenesis* 1995;16(6):1391-401.

Goodlett CR, Horn KH. Mechanism of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res Health*. 2001;25(3):175-182.

Grattagliano I, Vendemiale G, Errico F, Bolognino AE, Lillo F, Salerno M T, Altomare E. Chronic ethanol intake induces oxidative alterations in rat testis. *J Appl Toxicol*. 1997;17(5):307-311.

Halliwell B. Drug antioxidant effects: A basis for drug selection? *Drugs*. 1991;42(4):569-605.

Hoek JB, Pastorino JG. Ethanol, oxidative stress, and cytokine-induced liver cell injury. *Alcohol*. 2002;27(1), 63-8.

Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis*. 2001; 7 (6):349-354.

Ilavazhagan G, Bansal A, Prasad D, Thomas P, Sharma SK, Kain AK, Kumar D, Selvamurthy W. Effect of vitamin E supplementation on hypoxia-induced oxidative damage in male albino rats. *Aviat Space Environ Med*. 2001;72(10):899-903.

Jaiswal AK. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(10):1199-1207.

Johnson PJ. Acute and chronic liver disease. In: Marshall WJ, Bangert SK, editors. *Clinical Biochemistry-Metabolic and clinical aspects*, New York: Churchill Livingstone; 1995. p. 243-5.

Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Acikgoz F. Endodulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology*. 2004; 202(3):227-235.

Krishnamurthy S, Bieri JG. The absorption, storage, and metabolism of α -tocopherol- C^{14} in the rat and chicken. *J Lipid Res.* 1963; 4:330-6.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 464-478.

Lieber CS. Biochemical and molecular basis of alcohol-induced injury to liver and other tissues. *N Engl J Med.* 1988; 319(25):1639-1650.

Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim. Acta.* 1997; 257 (1): 59-84.

Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol.* 2004; 34 (1): 9-19.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275.

Maier H, Weidauer J, Zöller J, Seitz HK, Flentje M, Mall G et al. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res.* 1994;18(2):387-391.

Maito FL, Rados PV, Filho MS, Barbachan JJ, Quadros O. Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of, or topical exposure to, alcohol. *Alcohol*. 2003;31(1-2):1-6.

Mansouri A, Demeilliers C, Amsellem S, Pessavre D, Fromenty B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial dna in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 298 (2):737-743.

Martinez M, Martinez FE, da Cunha MR, Segatelli TM, Pinheiro PF, Almeida CC. Morphological effects on the hard palatine mucosa of *Calomys callosus* submitted to experimental chronic alcoholism. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2002; 34(1):77-83.

Martinez M, Martinez FE, Watanabe I. Morphological changes on the hard palatine mucosa of rats (*Rattus norvegicus albinus*) after chronic alcohol consumption. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1998;30(3):379-84.

Mascrès C, Joly J-G. Histochemical and ultrastructural study of the rat oral mucosa, after chronic administration of alcohol. *J Biol Buccale*. 1981; 9: 279-95.

McDonough KH. Antioxidant nutrients and alcohol. *Toxicology*. 2003;189(1-2):89-97.

McMillen BA, Crawford MS, Kulers CM, Williams HL. Effects of a metabotropic, MGLU5, Glutamate receptor antagonist on ethanol consumption by genetic drinking rats. *Alcohol Alcohol*. 2005;40(6):494-7.

Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1972;247(10):3170-5.

Neves MM, Borges DR, Vilela MP. Concentração de etanol nas bebidas mais consumidas no Brasil. *Gastroenterol Endosc Dig*. 1989;8:17-20.

Nordman R. Oxidative stress from alcohol in the brain. *Alcohol Alcohol Suppl*. 1987; 1: 75-82.

Nordmann R, Ribière C, Rouach H. Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol*. 1990; 25: 231-7.

Nordmann R, Ribière C, Rouach H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Rad Biol Med*. 1992; 12 (3):219-240.

Ohta A, Kobayashi T, Imai Y, Inui K, Yoshino J, Nakazawa S. Effect of oral vitamin E administration on acute gastric mucosal lesion progression in rats treated with compound 48/80, a mast cell degranulator. *Biol Pharm*. 2006;29(4):675-683.

Ribeiro MCP, de Ávila DS, Schneider CYM, Hermes FS, Furian AF, Oliveira MS et al. α -Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions. *Epilepsy Res.* 2005;66(1-3):185–194.

Schlörff EC, Husain K, Somani SM. Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol.* 1999;18(2-3):203-214.

Seitz HK, Simanowski UA. Alcohol and Carcinogenesis. *Annu Rev Nutr.* 1988; 8: 99-119.

Squier CA, Cox P, Hall BK. Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J Oral Pathol Med.* 1986;15(5):276-9.

Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Effect of ethanol on lipid metabolism and epithelial permeability barrier of skin and oral mucosa in the rat. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 595-9.

Valentine JA, Scott J, West CR, St Hill CA. A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. *J Oral Pathol.* 1985; 14: 654-65.

Valenzuela A. The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.* 1991;48(4):301-9.

Wang X, Cederbaum A. Acute ethanol pretreatment increases FAS-mediated liver injury in mice: Role of oxidative stress and CYP2E1-dependent and -independent pathways. *Free Rad Biol Med.* 2007; 42(7):971–984.

Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Prog. Lipid Res.* 1999; 38(4): 309-336.

Wu D, Cederbaum AI. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health.* 2003;27(4):277-284.

Table 1. Alcohol concentration increase per day in adaptation phase.

Day	1 st	2 nd	3 th	4 th	5 th	6 th	7 th
	5%	10%	15%	20%	25%	30%	40%

Table 2. Standard chow diet and solutions (water and 40% ethanol solution) consumption.

Group	n	Standard Chow diet	Solution
		Animal/day (g)	Animal/day (ml)
Control	6	12,53	37,92
Alcohol	10	6,35	15,15
Tween	6	11,56	38,15
Vitamin E	6	11,73	34,11
Alcohol Vitamin E	10	6,48	16,21

Results are expressed as mean.

Table 3. Initial and final weight (g) and change in body weight (%) of female Wistar rats in different experimental groups.

Group	n	Initial Weight (g)	Final Weight (g)	Change in body weight (%)
Control	6	230,25 (12,27)	232,33(10,40) ^a	0,96 (2,42) ^a
Alcohol	10	222,44 (21,57)	196,95(20,19) ^b	-11,21 B(7,75) ^b
Tween	6	228,37 (10,95)	229,82 (16,14) ^a	0,57 (3,19) ^a
Vitamin E	6	225,65 (9,84)	224,82(10,89) ^a	-0,37 (1,70) ^a
Alcohol Vitamin E	10	221,27 (19,53)	203,70 (15,00) ^b	-7,48 (9,11) ^b

Results are expressed as mean±standard deviation. ^{a-b}Values not sharing a common superscript letter differ significantly at p<0.05 (ANOVA followed by Tukey). NS=not significant.

Figure 1 – Oxidative damage parameters

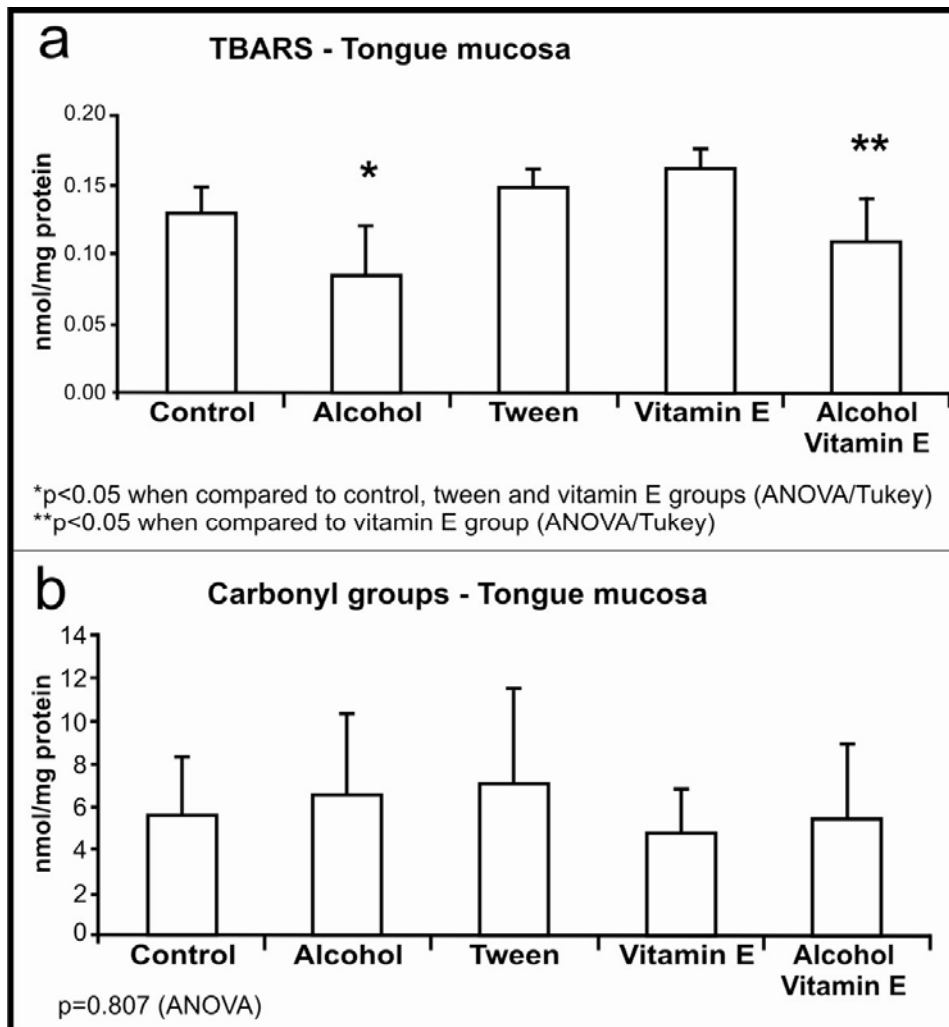


Figure 2 – Antioxidant enzymes activities

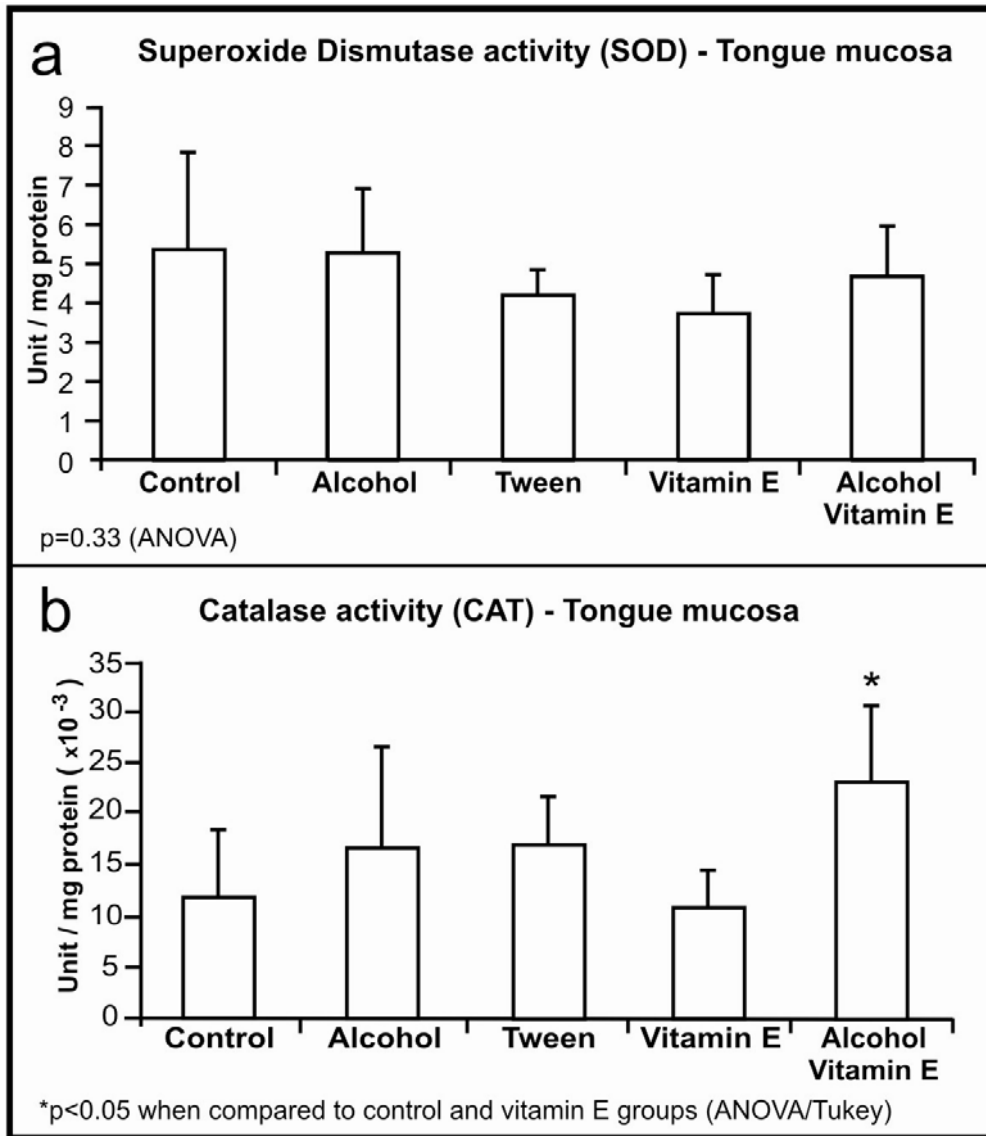
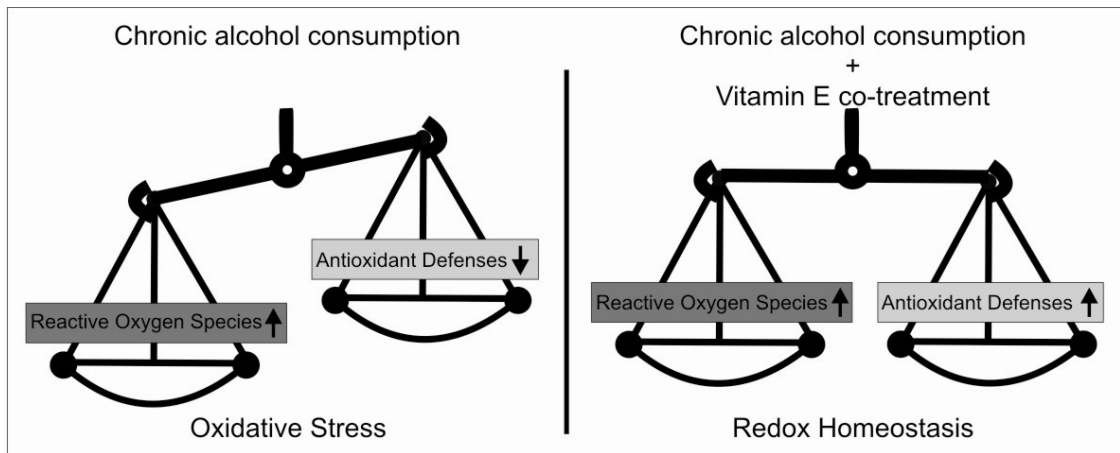


Figure 3 - Theoretical model of vitamin E protective mechanism



Cessation attenuates alcohol-related cell proliferation increase in tongue epithelium of rat

(Manuscrito formatado segundo as instruções para autores do periódico Carcinogenesis)

Running Title: Alcohol cessation effects on rat tongue

Vinicius Coelho Carrard^{a,b*}, Aline Segatto Pires^{a,b}, Marina Mendez^{a,b}, Matheus Augusto de Bittencourt Pasquali^b, Cristiano Macabu Badauy^a, Isabel da Silva Lauxen^a, José Cláudio Fonseca Moreira^b, Manoel Sant'Ana Filho^a

^a Laboratório de Histopatologia Prof. Dr. J. J. Barbachan - Oral Pathology. School of Dentistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

^b Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

* Corresponding author:

E-mail: vcarrard@yahoo.com.br

Mail Address: Rua Santa Cecília 1373/409, Porto Alegre, RS, Brasil 90420-041.

Tel.: +55-51-3308.5011; fax: +55-51-3308.5023.

Abbreviations:

AgNOR - argyrophilic proteins related to active nucleolar organizer regions; ANOVA – analysis of variance; CAT - catalase; CO₂- carbon dioxide; mAgNOR- mean of AgNOR number; Nrf2 - nuclear factor erythroid-2 related factor 2: redox sensitive transcription factor; pAgNOR >1 - percentage of cells with more than 1 AgNOR/nucleus; PBS - phosphate buffered saline ;ROS - reactive oxygen substances; SOD - superoxide dismutase; SOD/CAT ratio - superoxide dismutase to catalase enzymes ratio;TBARS - thiobarbituric acid reactive substances; rRNA - ribosomal ribonucleic acid

Abstract

Increase in cell proliferation is observed in oral epithelial due to chronic alcohol consumption. Oxidative stress has been considered to be a major mechanism to explain alcohol-related damage in several tissues. Since reactive oxygen species may acts in signaling for cell proliferation, we investigate the oxidative stress parameters and its relation to cell proliferation in tongue tissues of rats. Cell proliferation was assessed in dorsal and ventral tongue epithelium by means AgNOR quantification in histological sections. Oxidative stress parameters (thiobarbituric acid reactive substances, carbonyl groups, superoxide dismutase activity and catalase activity and immunocontent) and Nrf2 immunocontent were quantified in tongue homogenates. We found increase in cell proliferation of ventral tongue epithelium, but no alteration was found after 120 days of alcohol consumption. Interestingly, alcohol cessation after 60 days of alcohol consumption, induced increase in catalase activity and cell proliferation increase attenuation, as well as TBARS levels decrease. Vitamin E co-treatment was conducted in order to evaluate its protective effect. The alcohol/vitamin E group showed higher proliferation rate than the vitamin E group, suggesting that vitamin E co-treatment had no protective effects. Superoxide dismutase activity increase was found in the same groups, showing that the association was potentially noxious. These results suggest that alcohol-related increase in cell proliferation rate was reversible after alcohol cessation. In addition, we concluded that hydrogen peroxide could be implicated in cellular signaling for cell proliferation.

Keywords: AgNORs, Proliferative Activity, Alcohol, Cessation, Tongue Mucosa, α -tocopherol, alcohol drinking cessation

1. Introduction

Ethanol acts as an independent risk factor for oral cancer [1-2], but its mechanism of action remains unclear. Several studies have shown that epithelial proliferation [3-6] and permeability to tobacco carcinogens [7,8] increase in oral mucosa after alcohol exposure. These findings support the hypothesis that alcohol induces oral mucosa alterations which could be related to oral cancer occurrence.

Oxidative stress is the imbalance between reactive oxygen substances (ROS) generation and antioxidant responses capacity [9]. In these situations, ROS can react with and damage complex cellular molecules such as lipids, proteins, and DNA proteins [10]. This phenomenon could be one of the mechanisms associated with the alcohol-mediated increase in cell proliferation rates observed in literature [3-5] as well as with the risk of oral cancer attributed to alcohol [11-12]. Nrf2 is a redox-sensitive transcription factor involved in antioxidant defenses, that is usually associated with response to xenobiotics [13] and it may be involved in the pathogenesis of alcohol-induced cell and tissue damage. Vincon et al. [14] demonstrated that vitamin E supplementation might attenuate the epithelial proliferation increase in rat colon mucosa due to alcohol intake, that is possibly associated to antioxidant properties of vitamin E. No studies have been conducted to investigate the effects of alcohol cessation, neither the influence of vitamin E co-treatment on the oral mucosa oxidative stress parameters and cell proliferation rate.

AgNORs quantification is used as a proliferation marker that provides information about the velocity of cell proliferation (cell proliferation rate) during the cell cycle [15-16]. AgNORs are related to proteins involved in rRNA synthesis, which can be visualized as black dots in nucleolus using a silver staining technique [17]. This histochemical proliferation marker is different from the majority of immunohistochemistry ones, which indicate whether cells are or are not undergoing division (cell growth fraction) [15,16,18].

The aim of this study was to evaluate the effects of chronic alcohol intake, alcohol cessation and vitamin E co-treatment on epithelial cell proliferation rates, oxidative stress parameters, and on Nrf2 immunocontent of the tongue of rats. Since ROS may act on signaling for cellular proliferation the second aim was to investigate if oxidative stress parameters could be related to cell proliferation rate in tongue epithelium.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Alcohol was purchased from Cromoline-Química Fina (Diadema, SP, Brazil); α -tocopherol, from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA); Tween 80, from Riedel-de-Haën (Seelze, Niedersachsen, Germany); silver nitrate, acetic acid, formic acid and xylene, from Synth (Diadema, SP, Brazil); and silver nitrate, from Merck (Darmstadt, Hessen, Germany).

2.2. Animals and treatment

Forty-eight female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) weighing 190-260 g at 3 months of age were housed in a temperature-controlled room ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) and 12:12 h reverse light/dark cycles. This study was approved by the Research and Ethics Committee of the School of Dentistry of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol no. 190/05).

All animals were housed and maintained under standard conditions, and treated in accordance with the Guide of care and use of experimental animals [19].

Animals were assigned to the following six groups using a weighted stratified randomization method:

- 1) control (6 animals);
- 2) alcohol (10 animals);
- 3) alcohol cessation (10 animals);
- 4) tween (6 animals);
- 5) vitamin E (6 animals);
- 6) alcohol/vitamin E (10 animals);

Animals in the control, tween and vitamin E groups were fed with a standard laboratory chow for rodents (Nuvilab/CR1, Nuvital Nutrientes LTDA, Colombo, Paraná, Brazil) and tap water ad libitum. The other experimental groups (alcohol, alcohol cessation and alcohol / vitamin E) received the same standard diet, but water was replaced with 40% (vol./vol.) ethyl alcohol throughout the experiment. The 40% alcohol concentration was chosen because it is the

same concentration found in “cachaça”, the type of distilled liquor most frequently consumed by the Brazilian population [20]. During the first week, alcohol concentration was increased gradually from 5% to 40% (adapted from McMillen et al [20]). After 60 days, 40% ethyl alcohol was replaced with water in the alcohol cessation group, gradually decreasing the alcohol concentration from 40% to 0% in one week.

Vitamin E (α -tocopherol dissolved on 5% tween 80 solution) was administered orally by gavage (200 mg/kg, twice a week; Kalender et al [22]) to rats in the alcohol/vitamin E and vitamin E groups. Alcohol, alcohol cessation and control animals received saline by gavage. Animals in the tween group received 5% tween 80 [23] solution at the same dose received by animals in the vitamin E and alcohol/vitamin E groups to evaluate the effect of vitamin E vehicle.

After 120 days, animals were killed by asphyxiation in a CO₂ chamber, and the tongue was removed.

2.3. Cell Proliferation

One half of the tongue of all specimens was fixed in 10% neutral buffered formalin for 24 hours and embedded in paraffin transversally so that all the epithelial layers and connective tissue could be visualized. Two 4- μ m histological sections were cut from each specimen: one was stained with hematoxylin-eosin, and the other was silver-stained for AgNOR count according to the method described by Ploton et al. [17]

Images of microscopic fields of all slides were captured with a Sony Digital Video Camera (DSC W50, Sony Co., Tokyo, Japan) connected to a binocular microscope Zeiss Standard 20 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) at 400 X magnification, 3 Mpx resolution and standardized optical zoom.

Dorsal and the ventral tongue epithelia of each slide were analyzed and images were recorded for 30 consecutive microscopic fields or for all the microscopic fields when there were fewer than 30 [3].

AgNOR dots per nucleus were counted using the manual count tool. On each slide 200 cells were assessed - 100 basal layer cells and 100 suprabasal layer cells from each anatomic site. Microscopic fields with superimposed cells, and areas of artifact were excluded. Dots that

could not be distinguished from each other were counted as a single dot, following the standardized counting method described by Crocker et al. [24]. In the granular cell layer, lysosomal acid phosphatase activity was indicated by silver granules, suggestive of apoptosis [25]; the areas with this type of staining were not included in this study [4]. AgNORs counts were recorded as mean AgNOR number per nucleus (mAgNOR) and percentage of cells with more than 1 AgNORs per nucleus (pAgNOR).

Measurement procedures were adjusted before evaluation, and the same procedures were repeated one week later (paired Student *t* test, $p=0.86$). An examiner who was unaware to which group the slides belonged performed the analysis.

2.4. Oxidative parameters

A third of the other half of the tongue was homogenized in 1000 μL of ice-cold phosphate saline buffer (PBS, pH 7.4), PBS (pH 7.4), sonicated in (4 cycles of 10s) in ice bath and stored at -80°C for further analyses.

2.4.1. Lipid peroxidation

The formation of TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) during an acid-heating reaction [26] was used as an index of lipid peroxidation. Briefly, 300 μL of samples were mixed with 600 μL of 15% trichloroacetic acid and 500 μL of 0,67% thiobarbituric acid, and heated in a boiling water bath for 20 min. TBARS were determined by the absorbance at 532 nm using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as an external standard. Results were expressed as malondialdehyde equivalents per milligram of protein.

2.4.2. Protein carbonyls

The oxidative damage to protein was quantified by the determination of carbonyl groups according to their reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) using a slightly modified version of the method described by Levine et al. [27]. Proteins precipitated due to the addition of 20% trichloroacetic acid and reacted with DNPH. After that, 8M urea was added, and carbonyl

contents were quantified by determining the absorbance at 370 nm using a molar absorption coefficient of 22,000 M⁻¹.

2.4.3. Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities

To determine CAT activity, tissue portions were sonicated in 50mM phosphate buffer, and the resulting suspension was centrifuged at 6200 x g for 10 min. The supernatant was used for the enzyme assay. CAT activity was quantified by the rate of decrease in hydrogen peroxide (10mM) absorbance at 240 nm [28]. SOD activity was assayed by quantifying the inhibition of adrenaline self-oxidation absorbance at 480 nm [29].

2.4.4. Protein quantification

All the results were normalized to protein content [30].

2.4.5. Immunoblot (CAT and Nrf2)

Tongue homogenates were lysed in Laemmli sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% [w/v] SDS, 10% [v/v] glycerol) and an equal amount of cell protein (60 mg/well) was fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Protein loading and electroblotting efficiency were evaluated using Ponceau S staining, and the membrane was blocked in tween-tris buffered saline (TTBS: 100mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 0.9% NaCl and 0.1% Tween-20) containing 5% albumin and incubated overnight with the primary antibody to be tested. The membrane was washed, and the immunoreactivity was detected by enhanced chemiluminescence.

Densitometric analysis of the films was performed with the IMAGE J® software (available on <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Blots were developed to be linear in the range used for densitometry. All results were expressed as a relative ratio between the CAT and Nrf2 immunocontent and β -actin internal control immunocontent.

2.5. Correlation between cell proliferation rate and oxidative parameters

The correlation between cell proliferation rate and oxidative parameters was assessed because ROS may be involved in cellular signaling for cell proliferation. Cell proliferation parameters were mAgNOR and pAgNOR [31].

2.4.6. Statistical analysis

Analysis of Variance (ANOVA) was used to compare means between groups when data followed a normal distribution. Tukey test was used for multiple comparisons (post-hoc test). When data did not follow a normal distribution Kruskal Wallis followed by Mann Whitney were used. The results were considered statistically significant if the p-value was <0.05 . The data are shown in graphs as mean values, standard deviations and mean rank. Pearson's correlation coefficient was used to test the correlation between oxidative stress parameters and cell proliferation.

3. Results

Animal body weight at the end of experiment and weight gain percentage, used to control the effect of diet, were not statistically different between experimental groups (data not shown, $p=0.33$ and $p=0.72$, respectively, ANOVA).

3.1. Cell proliferation rate (Figure 3A)

Animals in the alcohol, alcohol cessation and alcohol/vitamin E groups showed no changes statistically significant differences in mAgNOR in basal (data not shown, $p=0.09$, ANOVA) and in suprabasal layer cells (data not shown, $p=0.11$, ANOVA) of dorsal tongue epithelium, or in basal layer cells of ventral tongue epithelium (data not shown, $p=0.07$, ANOVA).

mAgNOR in suprabasal layer cells of ventral tongue epithelium increased in alcohol-treated animals when compared with control animals, and in animals in the alcohol/vitamin E group when compared with animals in the vitamin E group (Figure 1A).

mAgNOR decreased in the suprabasal layer cells of ventral tongue epithelium (Figure 1A and B) in the alcohol cessation group. Since pAgNOR showed similar results, it was not presented.

3.2. Oxidative Parameters

3.2.1. Lipid peroxidation

No differences were found in the comparison of animals in the groups that received alcohol or alcohol and vitamin E co-treatment. In the alcohol cessation group, TBARS levels decreased ($p < 0.05$, ANOVA) when compared with the control and alcohol/vitamin E groups (Figure 2A).

3.2.2. Protein carbonyls – Figure 2B

No effects on protein carbonyls were found in the alcohol, alcohol cessation and alcohol/vitamin E groups ($p = 0.10$, ANOVA).

3.2.3. Superoxide dismutase activity (SOD)

Alcohol vitamin E treated animals showed a SOD increase when compare to others groups, except vitamin E animals ($p = 0.05$, ANOVA), but alcohol group had no effects on SOD (Figure 3A).

3.2.4. Catalase activity and immunocontent

In a previous study of our group on alcohol acute effects (data not shown) it was observed that short period with alcohol and vitamin E treatment increased CAT activity. In the present study, although the administration of alcohol for a long period showed no effects on CAT activity (Figure 3B), the immunocontent of CAT protein decreased (Figure 4A). Alcohol cessation restored CAT activity and decreased CAT immunocontent. Vitamin E co-treatment attenuated alcohol effects upon CAT immunocontent, but no changes in CAT activity were found.

3.2.5. SOD/CAT ratio

SOD/CAT ratio evaluation showed that alcohol and alcohol cessation groups showed a decreased SOD/CAT ratio ($p < 0.05$, ANOVA) when compared with the results of alcohol vitamin E group (Figure 3C).

3.2.6. Nrf2 immunocontent

After the observation of the decrease in CAT immunocontent in the alcohol and alcohol cessation groups, we decided to evaluate Nrf2, a CAT transcription factor that is overexpressed in response to noxious agents. Alcohol consumption and alcohol cessation decreased Nrf2 immunocontent (Figure 4B). Vitamin E co-treatment attenuated alcohol-related Nrf2 decrease. The vitamin E group also showed a reduction in Nrf2, but treatment with Tween 80 alone attenuated this effect.

3.3. Correlation between cell proliferation rate and oxidative parameters

To verify whether one of the oxidative parameters was the source of changes in cell proliferation rate due to alcohol, the Pearson correlation test was used, and results showed that CAT activity was inversely correlated with cell proliferation rate according to the analysis of pAgNOR (figure 5B; $R=0.32$; $p<0.05$, ANOVA). Lipid peroxidation levels (TBARS, $p=0.58$, ANOVA), carbonyl groups ($p=0.68$, ANOVA) and SOD activity ($p=0.34$, ANOVA) did not show any correlation with cell proliferation rates. The analysis of mAgNOR showed no association with any oxidative parameters (data not shown).

4. Discussion

The aim of this study was to evaluate the possible involvement of oxidative stress in the increasement of alcohol-related oral epithelium cell proliferation. Some studies have found morphological [6] and renewal disturbances [3-5] in oral epithelial tissue due to alcohol, but the mechanisms related remains obscure. In addition, the damage reversibility was not been directly assessed in literature.

4.1. Evaluation of cell proliferation rate

Several authors agree that oral epithelium proliferation increases after chronic alcohol intake [3-6]. However, the exact mechanism of such increases remains unknown. This study investigated whether the increase in alcohol-related cell proliferation was associated with

oxidative stress, and whether alcohol cessation and vitamin E co-treatment might attenuate alcohol damage.

Our study focused on the tongue, one of the anatomic sites with the highest risk for the development of oral cancer. Dorsal and ventral tongue epithelia were examined because these anatomic sites might be more susceptible to malignant transformation [32].

4.1.1. Dorsal tongue epithelium

The analysis of cell proliferation rates revealed no differences between groups in basal ($p=0.09$) and suprabasal ($p=0.11$) layer cells of dorsal tongue epithelium (data not shown). This finding differs from those reported in previous studies [3, 5], which found higher proliferative activity in the suprabasal layer cells of dorsal tongue epithelium. This difference could be explained by the different animal models used (rats instead of mice), as these animals respond differently to alcohol [33].

4.1.2. Ventral tongue mucosa

Basal layer cells did not show changes in cell proliferation rates after alcohol intake, alcohol intake and vitamin E co-treatment, or alcohol cessation (data not shown, $p=0.07$). However, the analysis of suprabasal layer cells revealed that alcohol intake increased cell proliferation rates. If a longer intake period was used, as in other studies [3, 5], the dorsal tongue epithelium might have shown the same changes. This finding corroborates the results of studies that found an increase in the tongue epithelium of mice cell proliferation whether a longer intake period was used [3, 5]. Carrard et al. [3] and Maito et al. [5] found that cell proliferation increased in the suprabasal layer cells of dorsal and ventral tongue epithelia. Valentine et al. [6] found an increase in proliferative compartment thickness in the tongue epithelium of humans that usually consume alcohol.

Our findings support the hypothesis that the ventral tongue mucosa is more susceptible to alcohol damage. Lederman [34] mentioned that alcohol had a stronger effect on structures belonging to the “food channel” and “reservoir” systems. A lower grade of keratinization and a longer contact with the ingested alcohol may also contribute to this effect.

According a previous study [3], basal cells seem to be constantly undergoing physiologic division. Therefore, when there is greater demand for cell replacement, suprabasal layer cells, which do not usually have a high proliferative rate, play this protective role. Another possible explanation is that proliferative controls in the basal layer cells are capable of repairing the aggression caused by the use of alcohol without disturbing the rate of cell proliferation. At the same time, although the type of aggression is the same, proliferative controls of suprabasal layer cells are probably less efficient, which may lead to an increase in proliferation as an adaptive response [4].

Vincon et al. [14] reversed the increase in alcohol-related proliferation in the colon mucosa of rats by means of vitamin E supplementation. In our study, no protective effects of vitamin E were found. Maybe the action of vitamin E varies according to anatomic site, or maybe our study dose was not enough to achieve optimal vitamin E levels in tongue tissues. Vitamin E modulates the rate of cell proliferation in several different ways according to cell type. The molecular basis of sensitivity to vitamin E remains unclear: a different signaling pathway may be used for proliferation in various cell types; or maybe vitamin E transport and metabolism vary according to cell type [35]. Finally, binding proteins [36] associated with vitamin E inhibition may be present in some cells but not in others. Chatelain et al. [37] reported that vitamin E may inhibit protein kinase C, an enzyme that plays a role in proliferation signaling pathways, but their study was performed with smooth muscle cells and not oral tissues. Our findings suggest that the mechanism associated with proliferation increase may not be susceptible to vitamin E control in tongue epithelium.

Ogden, Wight, Rice [38] did not find differences in oral smears obtained from binge drinkers (individuals that drink alcoholic beverages occasionally) and regular drinkers. Alcohol cessation has not been assessed elsewhere. Castellagué et al [39] performed a case-control study where it was demonstrated that alcohol cessation could decrease of oral cancer risk, but this topic is controversial [39, 40]. Our evaluation of cell proliferation rate revealed a remarkable finding in relation to alcohol cessation, and suggested that alcohol cessation might return cell proliferation rates to levels similar to those found in the control group. This finding supports the hypothesis that alcohol acts only as a promoter, and not as an initiator, of oral cancer [41]. We believe that if the increases in alcohol-related proliferation rates were associated with proto-

oncogene mutations, increases in cell proliferation rates would be found even after alcohol cessation. Nevertheless, the increase in cell proliferation may be the first step in oral carcinogenesis. Fast turnover tissues are more susceptible to DNA duplication errors [42, 43]. Mechanisms responsible for the increase in cell proliferation rates may involve some cell proliferation signaling pathways, some adaptive response to external stimulation, or both [44].

The required cessation time to reverse alcohol damage is difficult to determine. We arbitrarily conducted a study of 2 months of alcohol intake and 2 months of alcohol cessation. It is unclear whether the time of cessation should be similar to duration of consumption in human beings. Moreover, the imbalance of oxidative stress parameters (SOD, CAT, TBARS) showed that the duration of alcohol cessation was not enough for tissues to achieve physiological homeostasis.

4.2. Oxidative parameters

4.2.1. Lipid peroxidation and protein oxidative damage

Increases in alcohol-related lipid peroxidation levels have been demonstrated in liver [45], testes [46], kidney [47] and central nervous system [48], but studies using oral tissues are not found in the reviewed literature.

Animals in the alcohol and alcohol/vitamin E groups did not have changes in TBARS levels. In the alcohol cessation group, TBARS levels decreased, probably as a consequence of increase in CAT activity. Although cell proliferation increase was attenuated in this group, these changes in oxidative parameters may be potentially harmful, because basal levels of ROS are required for proper cell signaling [49,50].

4.2.2. Superoxide dismutase activity

The effects of alcohol on SOD activity vary according to tissue studied, as well as to dose and method of alcohol administration [51-52]. Alcohol and vitamin E co-treatment were associated with higher SOD activity, which may be associated to the noxious effect of this association.

4.2.3. CAT activity, CAT and Nrf2 immunocontent

CAT activity was not associated with CAT immunocontent: although CAT immunocontent was lower in alcohol-treated animals, CAT activity was maintained. Catalase activity may be modulated by a different mechanism, such as substrate concentration or allosteric activators, and not only by enzyme concentration [53]. Some studies showed that MEOS, one of the routes of alcohol metabolism, generates hydrogen peroxide [54]. This might be the pathway involved in the increase in CAT activity found in the alcohol cessation group. Nrf2 evaluation revealed that its effects were similar to those of CAT immunocontent, which indicates that alcohol-related CAT induction is an indirect effect of alcohol toxicity by means of this transcription factor.

4.2.4. SOD/CAT ratio

Despite the SOD/CAT ratio imbalance and Nrf2 immunocontent decrease in the alcohol cessation group, no damage was found when oxidative stress damage parameters (TBARS and carbonyl groups) were analyzed.

4.2.5. Correlation of cell proliferation and oxidative parameters

The evaluation of the suprabasal cell layer of the ventral tongue epithelium revealed some important correlations between cell proliferation rate and CAT activity. Our findings indicate that cellular signaling for cellular proliferation may occur by means of hydrogen peroxide stimulation in this tissue [49,50]. This hypothesis is also supported by the results of the alcohol cessation group, which showed a CAT activity increase and a cell proliferation decrease when compared with the results of the alcohol group.

Warnakularuriya et al [55] demonstrated that drinkers who had been diagnosed with oral pre-cancer or squamous cell carcinoma showed higher lipid peroxidation levels on lesion biopsies. Nevertheless, it is difficult to define if these oxidative stress indicators are the source or the consequence of molecular alterations presented in these lesions. We agree with Warnakularuriya et al [55] when they stated that the exact role of alcohol consumption in oral carcinogenesis remains obscure, but our findings so far suggest that it may act as a tumor promoter and may lead to the occurrence of cumulative damage.

Based on this study, we concluded that alcohol cessation may attenuate epithelial proliferation increase induced by chronic alcohol intake, but associated oxidative parameters make oral tissues more susceptible to damage. Our findings suggest that signaling for cell proliferation occurs by means of hydrogen peroxide in oral mucosa. The primary mechanisms of alcohol-induced carcinogenesis have remained poorly defined.

6. Acknowledgements

The authors would like to thank to Sabrina P. Moure, Fernanda Visioli and Elisabete U. Rojas for assistance in surgical procedures as well as to Caren Bavaresco, Christiane Gerhard, Mailing Leitão, Adriana Aguiar, Leandro Nunes and Luciana Adolfo for excellent technical support. The authors thank also to Laboratório de Histopatologia Prof. Dr. J. J. Barbachan, to Centro de Estudos em Estresse Oxidativo (Laboratório 32), to Biblioteca Malvina Vianna da Rosa and to FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde). This study was supported by CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (Brazilian Agency for the Improvement of Higher Education Personnel), Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (National Council for Scientific and Technological Development).

7. References

- [1] Talamini, R., Franceschi, S., Barra, S. and La Vecchia, C. (1990) The role of alcohol in oral and pharyngeal cancer in non-smokers, and of tobacco in non-drinkers. *International journal of cancer.*, **46**, 391-393.
- [2] Znaor, A., Brennan, P., Gajalakshmi, V., Mathew, A., Shanta, V., Varghese, C. and Boffetta, P. (2003) Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *International journal of cancer.*, **105**, 681-686.
- [3] Carrard, V.C., Filho, M.S., Rados, P.V., Chaves, A.C. and Lauxen Ida, S. (2004) Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. *Alcohol.*, **34**, 233-238.
- [4] Maier, H., Weidauer, H., Zoller, J., Seitz, H.K., Flentje, M., Mall, G. and Born I.A. (1994) Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res.*, **18**, 387-391.
- [5] Maito, F.L., Rados, P.V., Filho, M.S., Barbachan, J.J. and Quadros, O. (2003) Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of, or topical exposure to, alcohol. *Alcohol.*, **31**, 25-30.

- [6] Valentine, J.A., Scott, J., West, C.R. and St Hill, C.A. (1985) A histological analysis of the early effects of alcohol and tobacco usage on human lingual epithelium. *J Oral Pathol.*, **14**, 654-665.
- [7] Du, X., Squier, C.A., Kremer, M.J. and Wertz, P.W. (2000) Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med.*, **29**, 80-85.
- [8] Squier, C.A., Cox, P. and Hall, B.K. (1986) Enhanced penetration of nitrosornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. *J Oral Pathol.*, **15**, 276-279.
- [9] Wu, D., Zhai, Q. and Shi, X. (2006) Alcohol-induced oxidative stress and cell responses. *J Gastroenterol Hepatol.*, **21**, 26-29.
- [10] Wu, D. and Cederbaum, A.I. (2003) Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alcohol Res Health.*, **27**, 277-284.
- [11] Guyton, K.Z. and Kensler, T.W. (1993) Oxidative mechanisms in carcinogenesis. *Br Med Bull.*, **49**, 523-544.
- [12] Klaunig, J.E. and Kamendulis, L.M. (2004) The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, **44**, 239-267.
- [13] Motohashi, H. and Yamamoto, M. (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med.*, **10**, 549-557.
- [14] Vincon, P., Wunderer, J., Simanowski, U.A., Koll, M., Preedy, V.R., Peters, T.J., Werner, J., Waldherr, R. and Seitz, H.K. (2003) Inhibition of alcohol-associated colonic hyperregeneration by alpha-tocopherol in the rat. *Alcohol Clin Exp Res.*, **27**, 100-106.
- [15] Schwint, A.E., Gomez, E., Itoiz, M.E. and Cabrini, R.L. (1993) Nucleolar organizer regions as markers of incipient cellular alterations in squamous epithelium. *J Dent Res.*, **72**, 1233-1236.
- [16] Sirri, V., Roussel, P. and Hernandez-Verdun, D. (2000) The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron.*, **31**, 121-126.
- [17] Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F. and Adnet, J.J. (1986) Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J.*, **18**, 5-14.
- [18] Derenzini, M., Trere, D., Pession, A., Govoni, M., Sirri, V. and Chieco, P. (2000) Nucleolar size indicates the rapidity of cell proliferation in cancer tissues. *The Journal of pathology.*, **191**, 181-186.
- [19] Olert, E.D., Cross, B.M. and McWilliams, A.A. (1993) Guide to care and use of experimental animals. Canadian Council on Animal., Ottawa, 2nd ed.
- [20] Neves, M.M., Borges, D.R. and Vilela, M.P. (1989) Concentração de etanol nas bebidas mais consumidas no Brasil. *Gastroenterol Endosc Dig.*, **8**, 17-20.
- [21] McMillen, B.A., Crawford, M.S., Kulers, C.M. and Williams, H.L. (2005) Effects of a metabotropic, mglu5, glutamate receptor antagonist on ethanol consumption by genetic drinking rats. *Alcohol Alcohol.*, **40**, 494-497.
- [22] Kalender, S., Kalender, Y., Ogutcu, A., Uzunhisarcikli, M., Durak, D. and Acikgoz, F. (2004) Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology.*, **202**, 227-235.
- [23] Krishnamurthy, S. and Bieri, J.G. (1963) The Absorption, Storage, and Metabolism of Alpha-Tocopherol-C14 in the Rat and Chicken. *J Lipid Res.*, **4**, 330-336.
- [24] Crocker, J., Boldy, D.A. and Egan, M.J. (1989) How should we count AgNORS? Proposals for a standardized approach. *The Journal of pathology.*, **158**, 185-188.
- [25] Mascres, C. and Joly, J.G. (1981) Histochemical and ultrastructural study of the rat oral mucosa, after chronic administration of alcohol. *J Biol Buccale.*, **9**, 279-295.
- [26] Valenzuela, A. (1991) The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci.*, **48**, 301-309.
- [27] Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S. and Stadtman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, **186**, 464-478.
- [28] Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, **105**, 121-126.
- [29] Misra, H.P. and Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.*, **247**, 3170-3175.
- [30] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, **193**, 265-275.

- [31] Xie, X., Clausen, O.P., Sudbo, J. and Boysen, M. (1997) Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.*, **79**, 2200-2208.
- [32] Boffetta, P., Mashberg, A., Winkelmann, R. and Garfinkel, L. (1992) Carcinogenic effect of tobacco smoking and alcohol drinking on anatomic sites of the oral cavity and oropharynx. *International journal of cancer.*, **52**, 530-533.
- [33] Tabakoff, B. and Hoffman, P.L. (2000) Animal models in alcohol research. *Alcohol Res Health.*, **24**, 77-84.
- [34] Lederman, M. (1964) The Anatomy of Cancer. with Special Reference to Tumours of the Upper Air and Food Passages. *J Laryngol Otol.*, **78**, 181-208.
- [35] Azzi, A., Boscoboinik, D., Chatelain, E., Ozer, N.K. and Stauble, B. (1993) d-alpha-tocopherol control of cell proliferation. *Mol Aspects Med.*, **14**, 265-271.
- [36] Nalecz, K.A., Nalecz, M.J. and Azzi, A. (1992) Isolation of tocopherol-binding proteins from the cytosol of smooth muscle A7r5 cells. *Eur J Biochem.*, **209**, 37-42.
- [37] Chatelain, E., Boscoboinik, D.O., Bartoli, G.M., Kagan, V.E., Gey, F.K., Packer, L. and Azzi, A. (1993) Inhibition of smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity by tocopherols and tocotrienols. *Biochim Biophys Acta.*, **1176**, 83-89.
- [38] Ogden, G.R., Wight, A.J. and Rice, P. (1999) Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. *J Oral Pathol Med.*, **28**, 216-220.
- [39] Castellsague, X., Quintana, M.J., Martinez, M.C., Nieto, A., Sanchez, M.J., Juan, A., Monner, A., Carrera, M., Agudo, A., Quer, M., Muñoz, N., Herrero, R., Franceschi, S. and Bosch, F.X. (2004) The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *International journal of cancer.*, **108**, 741-749.
- [40] Franceschi, S., Levi, F., Dal Maso, L., Talamini, R., Conti, E., Negri, E. and La Vecchia, C. (2000) Cessation of alcohol drinking and risk of cancer of the oral cavity and pharynx. *International journal of cancer.*, **85**, 787-790.
- [41] Mufti, S.I. (1992) Alcohol acts to promote incidence of tumors. *Cancer Detect Prev.*, **16**, 157-162.
- [42] Melnick, R.L., Huff, J., Barrett, J.C., Maronpot, R.R., Lucier, G. and Portier, C.J. (1993) Cell proliferation and chemical carcinogenesis: symposium overview. *Environmental health perspectives.*, **101**, 3-7.
- [43] Tomatis, L. (1993) Cell proliferation and carcinogenesis: a brief history and current view based on an IARC workshop report. *International Agency for Research on Cancer. Environmental health perspectives.*, **101** Suppl 5, 149-51.
- [44] Preston-Martin, S., Pike, M.C., Ross, R.K. and Henderson, B.E. (1993) Epidemiologic evidence for the increased cell proliferation model of carcinogenesis. *Environmental health perspectives.*, **101**, 137-138.
- [45] Eke, B.C., Vural, N. and Iscan, M. (1996) Combined effects of ethanol and cigarette smoke on hepatic and pulmonary xenobiotic metabolizing enzymes in rats. *Chem Biol Interact.*, **102**, 155-167.
- [46] Nordmann, R., Ribiere, C. and Rouach, H. (1990) Ethanol-induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues. *Alcohol Alcohol.*, **25**, 231-237.
- [47] Pari, L. and Suresh, A. (2008) Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol.*, **46**, 1627-1634.
- [48] Emre, M.H., Aktay, G., Polat, A. and Vardt, N. (2007) Effects of benzo(a)pyrene and ethanol on oxidative stress of brain, lung tissues and lung morphology in rats. *Chin J Physiol.*, **50**, 143-148.
- [49] Genestra, M. (2007) Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal.*, **19**, 1807-1819.
- [50] Kamata, H. and Hirata, H. (1999) Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal.*, **11**, 1-14.
- [51] Schlorff, E.C., Husain, K. and Somani, S.M. (1999) Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol.*, **17**, 97-105.
- [52] Jurczuk, M., Brzoska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., Galazyn-Sidorczuk, M. and Kulikowska-Karpinska, E. (2004) Antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to cadmium and ethanol. *Food Chem Toxicol.*, **42**, 429-438.
- [53] Smith, C.M.A. Marks, A. and Lieberman, M.A. (ed.) *Marks' Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. Lippincott Williams & Wilkins 2004: pp.138-56.
- [54] Mello, T., Ceni, E., Surrenti, C. and Galli, A. (2008) Alcohol induced hepatic fibrosis: Role of acetaldehyde. *Mol Aspects Med.*, **29**, 17-21.

- [55] Warnakulasuriya, S., Parkkila, S., Nagao, T., Preedy, V.R., Pasanen, M., Koivisto, H. and Niemelä, O. (2008) Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. *J Oral Pathol Med.*, **37**, 157-165.

FIGURE LEGENDS

Fig.1 – (A) Cell proliferation rate in suprabasal layer cells of ventral tongue mucosa (B) Photomicrograph of ventral tongue epithelium of rat (Tween group) stained for cell proliferation rate evaluation: k - keratin layer; e - epithelial tissue; c - fibrous connective tissue; basal layer cells (arrows) and suprabasal layer cells (asterisk). AgNOR technique, original magnification, $\times 400$.

Fig. 2 - Lipid peroxidation (A) and carbonyl groups (B) in tongue tissues. The values are means \pm SD. (ANOVA, $p < 0.05$, followed by Tukey post hoc).

Fig.3 - Antioxidant enzyme activity in tongue tissue of rats in the Alcohol, Alcohol Cessation and Alcohol/Vitamin E groups. (A) Superoxide dismutase activity – SOD; (B) Catalase activity – CAT; (C) SOD/CAT ratio. The values are means \pm SD (ANOVA, $p < 0.05$, followed by Tukey post hoc) for CAT and mean rank (Kruskal Wallis followed by Mann Whitney test) for SOD and SOD/CAT ratio.

Fig. 4 - Representative immunoblots with respective densitometric analyses showing CAT (A) and Nrf2 (B) immunocontent in tongue tissues. Data normalized to β -actin content are expressed as means \pm S.E. for three individual experiments. $n=3$; (ANOVA, $p < 0.05$ followed by Tukey post-hoc).

Fig.5 - Correlation between cell proliferation rate (pAgNOR) and oxidative stress parameters in suprabasal layer cells in dorsal tongue epithelium of rats (Pearson's correlation coefficient, $p < 0.05$).

Figure 1

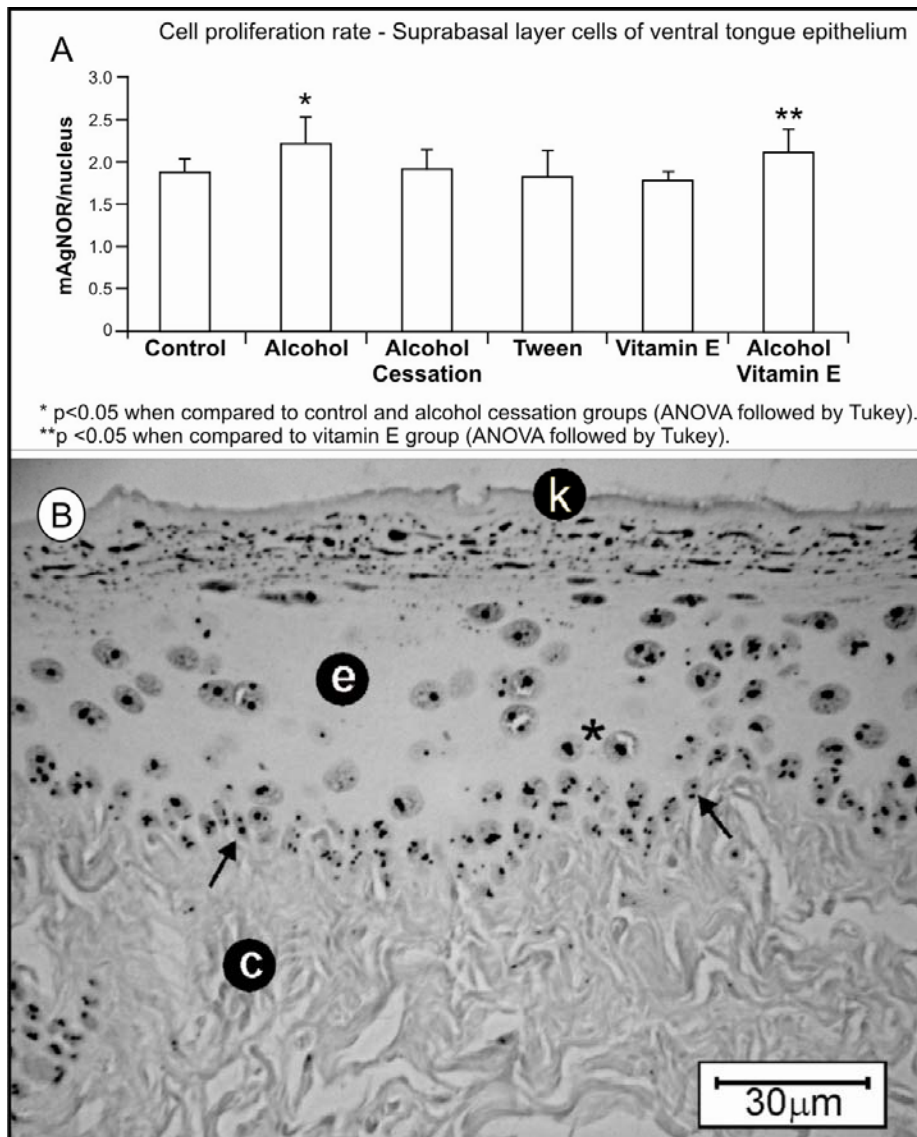


Figure 2

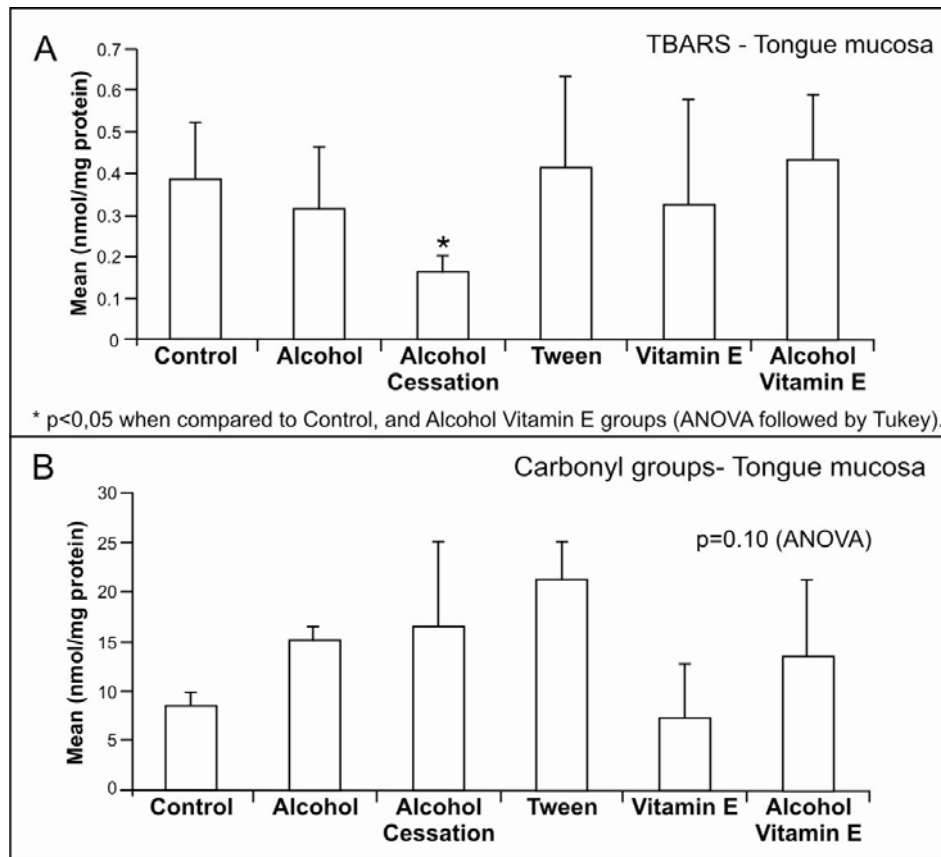


Figure 3

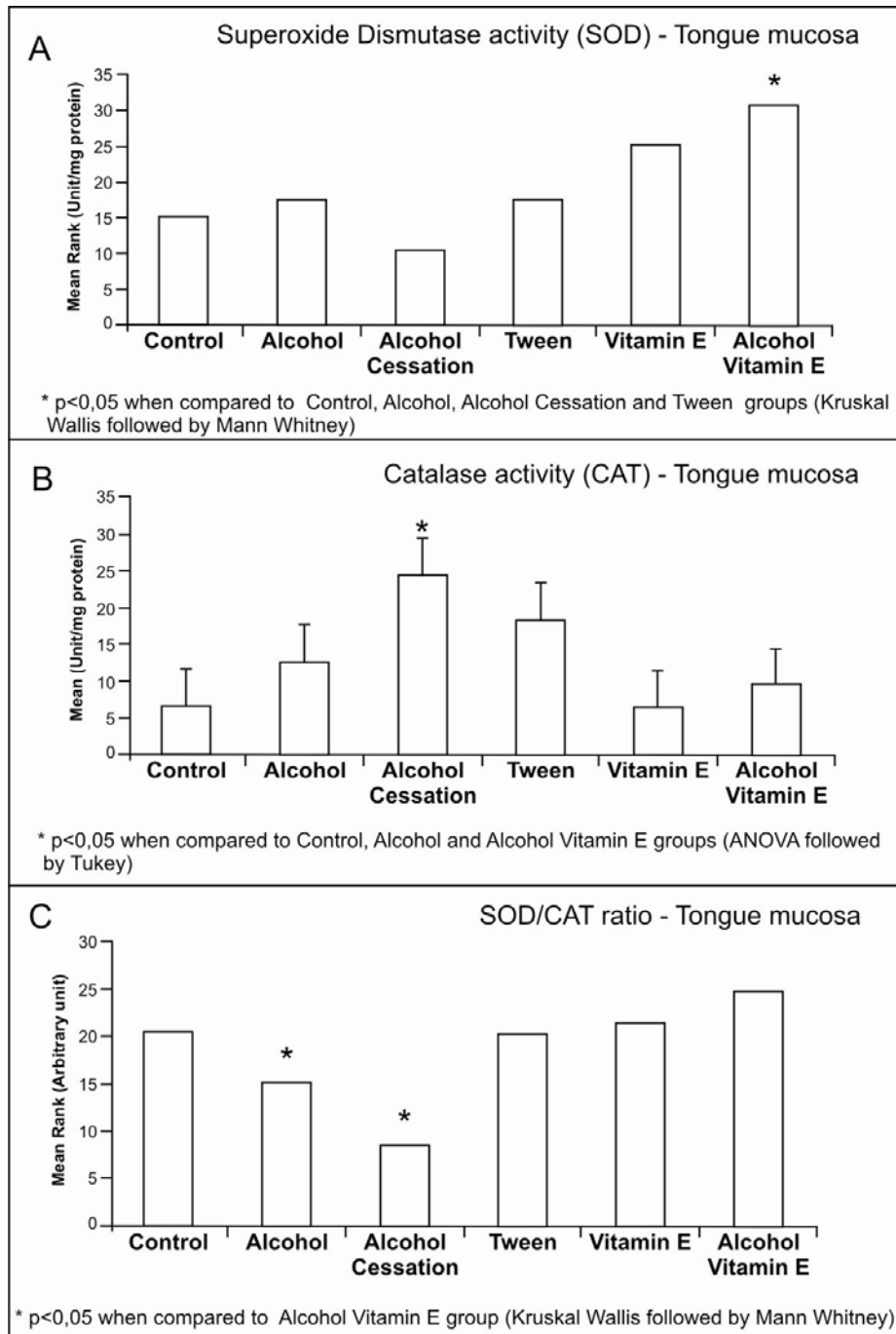


Figure 4

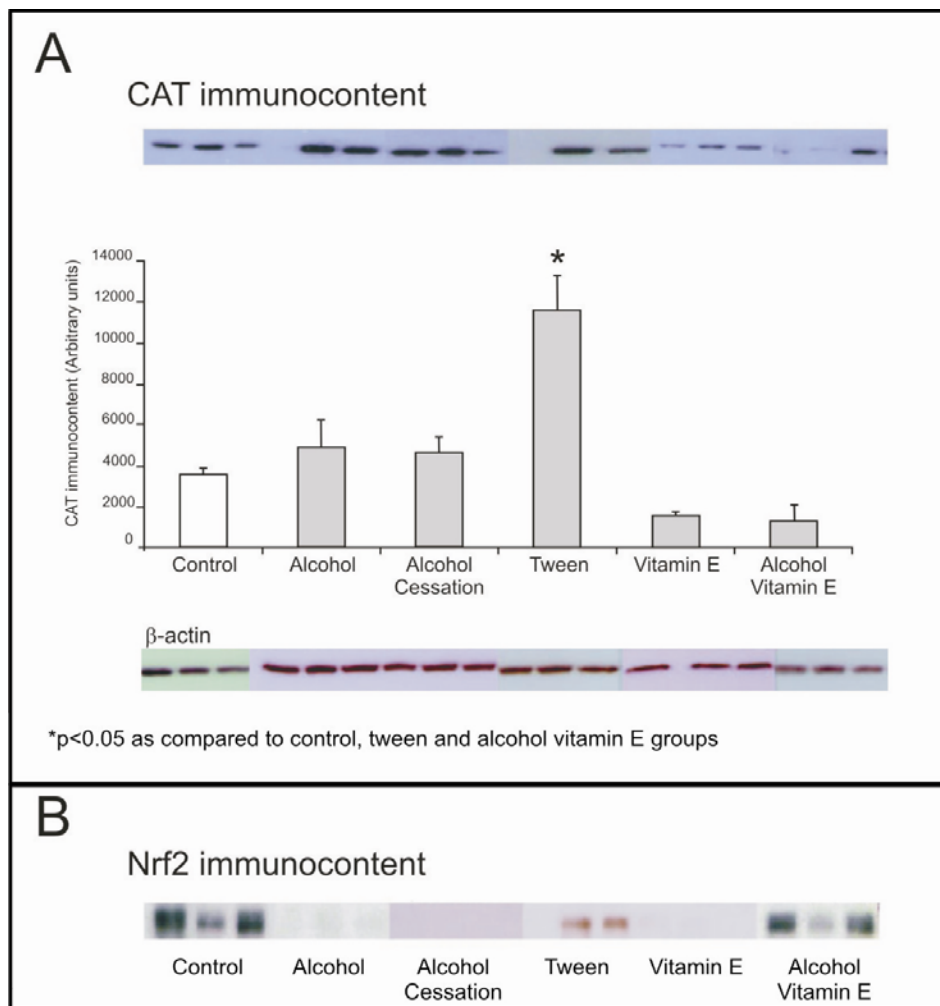
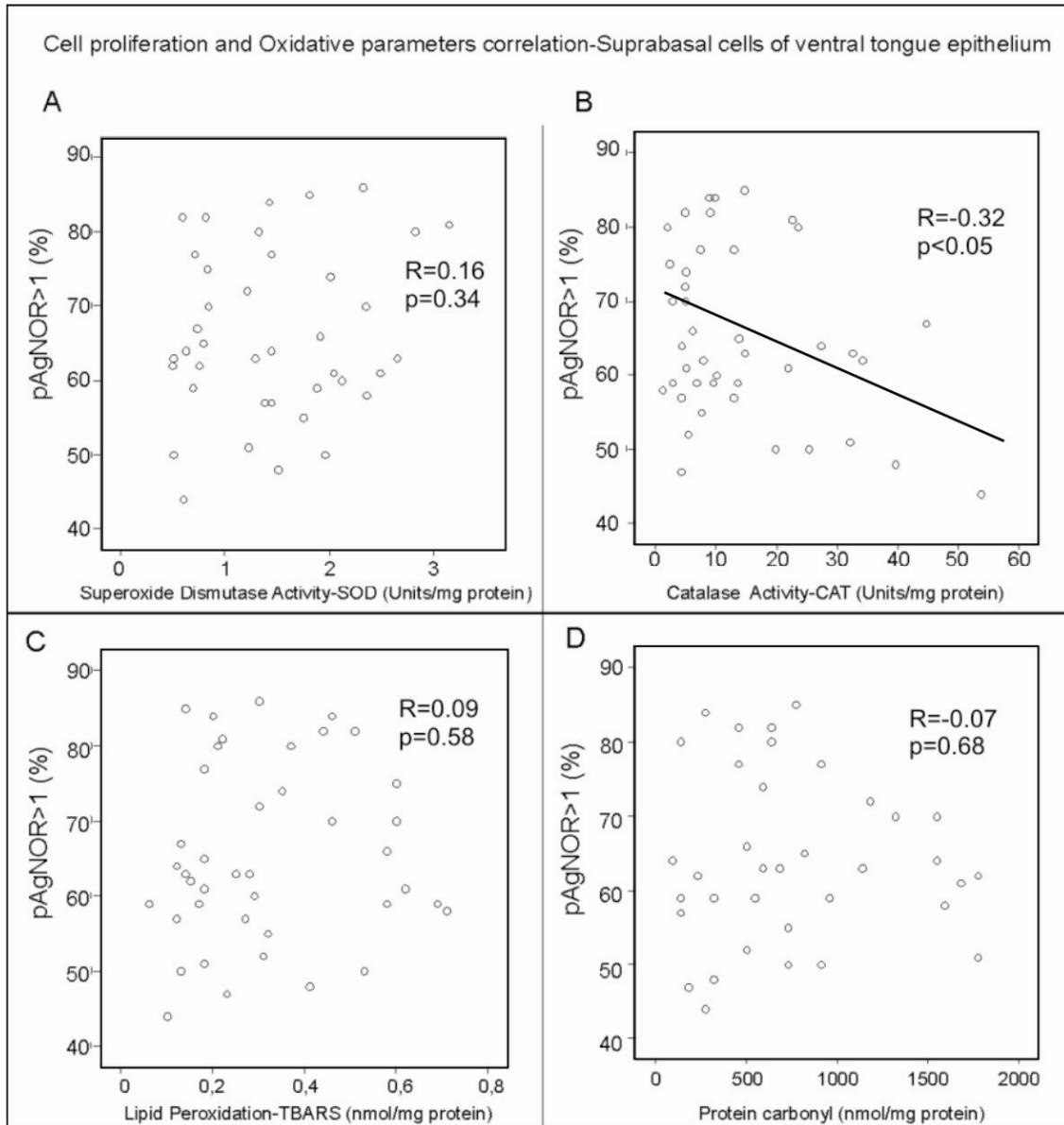


Figure 5



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação do consumo de etanol com desenvolvimento de câncer de boca (carcinoma espinocelular) é consenso na literatura (WYNDER, MUSHINSKI, SPIVAK, 1977; ROTHMAN, 1978; FRANCO et al., 1989; LLEWELLYN, JOHNSON, WARNAKULASURIYA, 2004). Entretanto, os mecanismos que explicam essa relação parecem incertos (WIGHT, OGDEN, 1998), bem como se o consumo de etanol isoladamente poderia determinar o aparecimento do câncer de boca. Em função disso, optou-se por realizar uma revisão de literatura, a fim de que possíveis mecanismos envolvidos fossem abordados. A partir dessa revisão, pode-se depreender que os seguintes mecanismos poderiam ter relação com o maior risco de desenvolver um câncer de boca frente ao consumo de etanol, ainda que mais estudos sejam necessários para suportar essas hipóteses:

- Aumento da permeabilidade do epitélio bucal aos carcinógenos provenientes da queima do tabaco, em função da ação tóxica do etanol, nas concentrações de 5% a 25%;

- Acúmulo de acetaldéido nos tecidos bucais, o que é possível em função da pouca atividade da ALDH (enzima que o metaboliza) nesses tecidos, do polimorfismo em relação às isoformas das enzimas de metabolização do etanol (ADH e ALDH) ou por meio da produção de acetaldéido pelos microrganismos presentes na boca;

- Estresse oxidativo, cujo envolvimento na carcinogênese em diversos tecidos é relatado na literatura, uma vez que os RLs ou EROs são gerados durante a metabolização do etanol e que os mecanismos antioxidantes podem estar menos ativos, permitindo que ocorressem alterações no DNA.

Alguns estudos mostram que o consumo crônico de etanol provoca aumento da atividade proliferativa do epitélio bucal. Os estudos desenvolvidos pelo nosso grupo (Maito, 2001; Sanfelice, 2001, Carrard et al 2004) confirmam essa relação e sustentam o papel do etanol como promotor em relação ao câncer bucal. A alteração da proliferação celular é um aspecto importante em relação à carcinogênese, pois a mesma pode favorecer a ocorrência de erros de DNA, podendo contribuir no desenvolvimento do câncer. Entretanto, o

aumento da proliferação celular por si só não pode ser considerado indiscriminadamente uma alteração sugestiva de malignização. Sabe-se que as ERO atuam como mensageiros para a proliferação celular e que frente à suplementação de vitamina E, Vincon et al. (2003) perceberam uma atenuação da atividade proliferativa aumentada pelo consumo de etanol na mucosa de cólon de ratos. Diante dessas evidências, a hipótese de que o estresse oxidativo estaria relacionado ao aumento da atividade proliferativa no epitélio lingual de ratos era bastante plausível. Esse aumento da atividade proliferativa poderia ser explicado pelo aumento dos níveis de EROs, os quais têm a capacidade de atuar como sinalizadores nesse contexto (Kamata, Hirata, 1999; Genestra, 2007).

Portanto, como não existiam estudos avaliando o efeito do consumo de etanol sobre parâmetros de estresse oxidativo na mucosa bucal, decidimos começar pelo estudo dos efeitos do consumo em curto prazo. Ainda que esse tipo de tratamento não tenha um foco diretamente na questão etanol e câncer bucal, essa idéia foi interessante, pois, além de inédita, proporcionaria uma avaliação do consumo eventual de etanol, tema sobre o qual existe pouco na literatura.

Ogden, Wight, Rice (1999) compararam esfregaços citológicos de mucosa bucal de indivíduos que bebiam etanol diariamente com aqueles que consumiam etanol de maneira intermitente. Observaram que o uso contínuo de etanol provocou alteração em parâmetros hematológicos, como aspartato-transaminase e volume corpuscular médio, que indicavam que os indivíduos apresentavam alterações hepáticas decorrentes do consumo de etanol. Contudo, as características citológicas avaliadas nos raspados de mucosa bucal (áreas nuclear e citoplasmática) não foram diferentes nos indivíduos que consumiam habitualmente etanol quando comparados aos consumidores eventuais. As diferenças em relação à espécie estudada e metodologia empregada tornam difíceis as comparações com o presente estudo.

Os resultados do estudo dos efeitos do consumo agudo de etanol (2º Artigo) indicaram uma redução nos níveis de TBARS (parâmetro de lipoperoxidação – 2º Artigo, Figura 1A) o que, pelo menos em parte, poderia mimetizar o consumo eventual. Por um lado, esse achado pode parecer positivo se interpretado como um indicativo de efeito antioxidante. Isso poderia

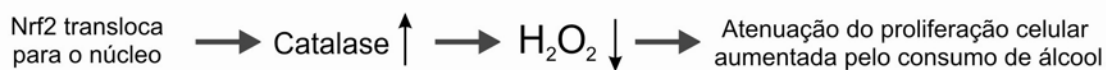
corroborar os efeitos benéficos do consumo eventual que são atribuídos ao etanol especialmente em estudos da área de cardiologia. Entretanto, deve-se interpretar esse achado como potencialmente danoso, uma vez que qualquer diferença em relação ao grupo controle é considerada indesejável. É importante enfatizar-se que um determinado nível de ERO é desejável, na medida em que os mesmos atuam como sinalizadores para os processos proliferação e diferenciação celulares, os quais poderiam encontrar-se prejudicados na deficiência desses mensageiros celulares. Além disso, encontramos aumento da atividade da CAT frente ao co-tratamento com álcool e vitamina E (2º Artigo, Figura 2B), o que foi considerada uma resposta adaptativa frente à toxicidade dessa associação. Contudo esses achados demonstram que, ao contrário do esperado, a associação teria efeitos negativos no que diz respeito ao equilíbrio redox e apresentava riscos potenciais de produzir dano na mucosa bucal caso o estudo fosse prolongado.

A continuação do experimento previa o estudo do efeito do consumo crônico, no qual alguns resultados bastante importantes foram encontrados. Os nossos achados reforçaram que o ventre lingual é mais suscetível aos danos relacionados ao etanol, uma vez que, dentro do período estudado, esse sítio mostrou alteração (3º Artigo, figura 3A), o que não foi observado no dorso lingual (dados não mostrados). Levando em consideração os estudos anteriores (MAITO et al., 2003; CARRARD et al., 2004) a respeito de consumo de etanol e proliferação celular no epitélio bucal, pode-se especular que um período de consumo um mais longo de tratamento levaria ao aumento da proliferação epitelial também no dorso lingual.

A atenuação da atividade proliferativa aumentada após a cessação do consumo de etanol (3º Artigo, figura 3A) foi outro resultado importante, o que confirma a reversibilidade dos efeitos do consumo de álcool na mucosa bucal sugerida previamente por Castellsagué et al. (2004) num estudo caso-controle. Com base nesses resultados, pode-se sugerir que o dano provocado pelo etanol está provavelmente ligado a mecanismos epigenéticos, o que reforça o seu papel de promotor no desenvolvimento do câncer de boca. Além disso, esse achado leva a crer que o dano é reversível e sugere que a redução e/ou suspensão do hábito deveria ser encorajada, especialmente em indivíduos fumantes. Por outro lado, Franceschi et al. (2000) demonstrou, também a partir

de um estudo caso-controle, que, mesmo após a cessação do consumo de etanol, o risco de desenvolvimento de câncer de boca permanecia elevado, o que mostra que esse tema é complexo e controverso.

Observamos uma relação inversa entre CAT e proliferação celular (3º Artigo, figura 5), sugerindo que o peróxido de hidrogênio atua como um sinalizador para a proliferação celular no tecido estudado. O fato de ter havido aumento da CAT (3º Artigo, figura 4B) e atenuação da atividade proliferativa (3º Artigo, figura 3A) no ventre lingual dos animais do grupo álcool cessação também serve para suportar essa relação. Em relação à SOD (3º Artigo, figura 4A) encontramos uma maior atividade no grupo álcool vitamina E, reforçando o efeito negativo da associação entre álcool e vitamina E nos tecidos linguais, o que já havia sido observado no 2º Artigo (figura 2A). Nesse grupo, observou-se aumento da SOD (3º Artigo, figura 4A), sem aumento correspondente da CAT (3º Artigo, figura 4B) e aumento da atividade proliferativa (3º Artigo, figura 3A). Provavelmente o aumento da atividade proliferativa foi causado pelo aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio em função do desbalanço entre SOD e CAT. Por outro lado, no grupo álcool cessação mostrou-se aumento da CAT (3º Artigo, figura 4B), mas não houve aumento da SOD (3º Artigo, figura 4A). Esses animais apresentaram atenuação da atividade proliferativa (3º Artigo, figura 3A), o que pode estar associado à redução dos níveis de peróxido de hidrogênio (esquema 2). Ainda que, do ponto de vista da atividade proliferativa, o grupo álcool cessação tenha mostrado um resultado favorável, a alteração dos parâmetros de estresse oxidativo TBARS e CAT sugere que um dano poderia estar ocorrendo. Existe a possibilidade de que um tempo maior de cessação viesse a normalizar esses parâmetros sem que outra alteração subsequente fosse observada. O mecanismo relacionado ao aumento da atividade proliferativa observado no grupo álcool parece ser diferente, uma vez que a atividade das enzimas antioxidantes não mostraram alterações quando avaliadas isoladamente. Além disso, quando a relação SOD/CAT foi analisada observou-se redução como no grupo álcool cessação ainda que o efeito sobre atividade proliferativa fosse diferente em cada um dos grupos referidos.



Esquema 2 – Mecanismo sugerido para atenuação do aumento da atividade proliferativa no grupo álcool cessação.

A suplementação de vitamina E não apresentou efeitos na modulação da atividade proliferativa no epitélio lingual dos ratos estudados. Além disso, o co-tratamento com vitamina E mostrou efeito pró-oxidante, pois induziu aumento da atividade da SOD (Artigo 3, figura 4A). Isso corrobora o que Halliwell, Gutteridge (2007) e Wu, Cederbaum (2003) que reportam que determinadas vitaminas podem se tornar peroxidativas em ambiente pró-oxidante. Da mesma forma que o etanol parece afetar cada tecido de maneira específica, o efeito protetor de vitamina E depende de características teciduais que provavelmente envolvem, por exemplo, proteínas transportadoras ou rotas de sinalização que não estão presentes em todas as células ou tecidos. Em mucosa esofágica de ratos, por exemplo, Odeleye et al. (1992) demonstraram que a suplementação de vitamina E foi capaz de atenuar os efeitos promotores do etanol por meio da inibição da peroxidação lipídica. Em função disso, o estresse oxidativo parece estar envolvido na patogênese do dano relacionado ao etanol nesse tecido. Alguns sítios da mucosa bucal apresentam características morfológicas semelhantes à mucosa esofágica, ou seja, um revestimento epitelial estratificado não ceratinizado. Contudo, quando se utiliza um modelo animal como o rato, é importante atentar que a mucosa bucal em geral apresenta um grau acentuado de ceratinização. Isso sustenta que os resultados observados em estudos experimentais com ratos devem ser analisados criticamente e a extrapolação dos mesmos para humanos deveria ser considerada com cuidado. Alguns fatores poderiam justificar o fato de o efeito protetor da vitamina E não ter sido observado no presente estudo:

1. A vitamina E não atingiu o nível plasmático necessário para atuar nos tecidos bucais. É possível que uma dose maior ou a utilização de outra via de administração mostrasse outros resultados.

2. O veículo utilizado (Tween) prejudicou a ação da vitamina E. O estudo do efeito agudo mostrou efeitos tóxicos desse detergente. Contudo a metodologia utilizada foi suportada pela literatura, que não relatava esses efeitos adversos observados no nosso estudo. A utilização de uma concentração menor de Tween (0,01% - Campos et al., 2005) ou mesmo de outro veículo, como o óleo de milho, seria recomendável em futuros estudos. Apenas Campos et al. (2005) utilizaram uma concentração mais baixa, porém o estudo não refere um motivo para essa modificação. Especulamos que algum estudo prévio ou piloto desse grupo tenha mostrado esse efeito negativo na concentração de 5%, determinando, assim, que concentrações mais baixas fossem preferidas nos estudos subsequentes.

3. A vitamina E só apresenta efeito em alguns tecidos. Cólon, esôfago e sistema nervoso central mostraram atenuação diante da suplementação de vitamina E, mas é possível que as rotas responsáveis por esses eventos não existam em todos os tecidos. Sabe-se que alguns tecidos dispõem mais de mecanismos antioxidantes enzimáticos e outros contam predominantemente com mecanismos não-enzimáticos.

Mesmo que os resultados observados não mostrem associação entre o aumento da atividade proliferativa pelo consumo de álcool e dano oxidativo, essa possibilidade ainda não pode ser descartada, uma vez que testes enfocando no dano oxidativo ao DNA não foram realizados. Warnakularuriya et al. (2008) demonstraram que indivíduos portadores de leucoplasia e carcinoma espinocelular de boca que consumiam etanol apresentavam aumentos dos níveis de peroxidação lipídica. Ainda que esse estudo possa sugerir uma relação entre dano oxidativo pelo consumo de etanol e carcinogênese, existe a probabilidade de o desbalanço oxidativo observado ser consequência, e não causa, das alterações presentes nessas lesões. Concordamos com esses autores quando os mesmos afirmam que o mecanismo primário que relaciona álcool e carcinogênese permanece pobremente compreendido.

Alguns dos nossos resultados apontam para tópicos que poderiam ser enfocados em futuros estudos. Diante da constatação de que a associação entre etanol e vitamina E pode ter efeitos negativos, a interação do álcool com fatores ambientais e nutricionais torna-se um campo de investigação promissor (WU, CEDERBAUM, 2003). Além disso, a identificação do peróxido de

hidrogênio como provável sinalizador para a proliferação celular nos tecidos estudados abre possibilidade para estudos com humanos envolvendo saliva. A hipótese de que a saliva poderia ser a fonte de peróxido que provoca o aumento da proliferação nos tecidos bucais se sustenta nos resultados relatados por Maier et al. (1986). Esses autores relatam que animais que foram tratados com etanol e tiveram as glândulas salivares removidas não apresentaram aumento da proliferação na mucosa bucal. Portanto, pode-se inferir que a saliva tem um papel importante na relação etanol x proliferação celular no epitélio de boca, o que suscita a realização de mais estudos nesse campo.

5. CONCLUSÕES

- Os mecanismos que relacionam consumo de etanol e desenvolvimento de câncer de boca (carcinoma espinocelular) ainda não estão completamente compreendidos;

- O consumo agudo de etanol provoca um desbalanço nos parâmetros oxidativos, indicando uma patogenicidade potencial, especialmente se associado à vitamina E;

- O consumo crônico de etanol provoca aumento da proliferação do epitélio bucal e o mesmo não tem relação com estresse oxidativo. A cessação do consumo atenua o aumento da atividade proliferativa induzido pelo álcool e provoca um desbalanço em alguns parâmetros antioxidantes.

6. REFERÊNCIAS

ALLISON, R. T.; BEST, T. p53, PCNA and Ki67 Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma: the Vagaries of Fixation and Microwave Enhancement of Immunocytochemistry. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.27, no.9, p.434-440, Oct. 1998.

BRUGERE, J et al. Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx, and mouth. **Cancer**, Philadelphia, v. 57, no.2, p. 391-395, Jan.1986.

CAMPOS, S. C. G. et al. Oxidative Stress in Alcohol-Induced Rat Parotid Sialadenosis. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 50, no.7, p. 661-668, July 2005.

CARRARD, V. et al. Quantification of silver-staining nucleolar organizer region in epithelial cells of tongue of mice after exposure to, or intake of, alcohol. **Alcohol**, New York, v.34, no. 2-3, p. 233-238, Oct.-Nov.2004.

CASTELLSAGUÉ, X., et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. **Int J. Cancer.**, New York, v. 108, no. 5, p. 741-749, Feb. 2004.

CHANCE, B.; SIES, H., BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organisms. **Physiol. Rev.**, Baltimore, v. 59, no. 3, p. 527-605, Jul.1979.

DREHER, D.; JUNOD, A. F. Role of oxygen free radicals in cancer development. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 32A, no. 1, p.30-38, Jan. 1996.

EKE, B.C.; VURAL et al, N.; ISCAN, M. Combined effects of ethanol and cigarette smoke on hepatic and pulmonary xenobiotic metabolizing enzymes in rats. **Chem. Biol. Interact.**, Limerick, v. 102, no. 3, p. 155-167, Dec. 1996.

EMRE, M.H. et al. Effects of benzo(a)pyrene and ethanol on oxidative stress of brain, lung tissues and lung morphology in rats. **Chin. J. Physiol.**, Taipei, v. 50, no. 3, p. 143-148, Jun. 2007.

ESPINA, N. et al. *In vitro* and *in vivo* inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O⁶-methylguanine transferase. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 9, no. 5, p. 761-766, May 1988.

- FIGUERO-RUIZ, E. et al. Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. **Med. Oral**, Valencia, v.9, no.1, p. 14-23, Jan-Feb 2004.
- FRANCESCHI, S. et al. Cessation of alcohol drinking and risk of cancer of the oral cavity and pharynx. **Int. J. Cancer**, New York, v. 85, no.6, p.787-790, Mar. 2000.
- FRANCO, E. L. et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 43, no.6, p. 992-1000, Jun. 1989.
- FREEDMAN, A.; SHKLAR, G. Alcohol and Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. **Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 46, no. 6, p. 794-805, Dec.1978.
- FRIDOVICH, I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v. 272, no. 30, p. 18515-18517, Jul. 1997.
- GARRIDO, N. et al. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. **Asian J. Androl.**, Shanghai, v. 6, no. 1, p. 59-65 Mar. 2004.
- GENESTRA, M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. **Cell Signal.**, New York, v. 19, no. 9, p. 1807-1819, Sept. 2007.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed.; Oxford: Oxford University press, 2007. p.166-174,.
- KABAT, G. C.; WYNDER, E. L. Type of alcoholic beverage and oral cancer. **Int. J. Cancer.**, New York, v. 43, no. 2, p.190-194. Feb. 1989.
- KAMATA, H. ; HIRATA, H. Redox regulation of cellular signalling. **Cell Signal.**, New York, v. 11, no. 1, 1-14, Jan. 1999.
- LIEBER, C. S. Biochemical and Molecular Basis of Alcohol-Induced Injury to Liver and Other Tissue. **N. Eng. J. Med.**, Boston, v. 319, no. 25, p. 1639-1650, Dec. 1988.
- LLESUE, S. F. Introducción y Especies Activas de Oxígeno. In: Marroni, N. P. **Estresse Oxidativo e Antioxidantes**. Editora de ULBRA, p.21-32, 2002.

LLEWELLYN, CD, JOHNSON, N.W.; WARNAKULASURIYA, K.A. Risk Factors for Oral Cancer in Newly Diagnosed Patients Aged 45 Years and Younger: a Case-Control Study in Southern England. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 33, no.9, 525-532, Oct. 2004.

LUNDY, J et al. The Acute and Chronic Effects of Alcohol on the Human Immune System. **Surg., Gynecol., Obstet.**, Chicago, v. 141, no. 2, p. 212-218, Aug. 1975.

MAIER, H. et al. The effect of chronic ethanol consumption on salivary gland morphology and function in the rat. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Oxford, v. 10, no. 4, p.425-427, Aug. 1986.

MAIER, H. et al. Effect of Chronic Alcohol Consumption on the Morphology of the Oral Mucosa. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, Oxford, v. 18, no. 2, p. 387-391, Apr. 1994.

MAITO, F. D. M. **Avaliação da Expressão do PCNA no Epitélio Lingual de Camundongos Submetidos à Ingestão e Aplicação Tópica de Álcool à 40°GL.** 2001. 40 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MAITO, F. L. et al. Proliferating Cell Nuclear Antigen Expression on Tongue of Mice After Intake of, or topical Exposure to, Alcohol. **Alcohol**, New York, v.31, no.1-2,p.25-30. Aug-Oct 2003.

MARNETT, L. J. Oxyradicals and DNA damage. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, no. 3, p. 361-370, Mar. 2000.

McDONOUGH, K. H. Antioxidant nutrients and alcohol. **Toxicology**, Limerick, v. 189, no. 1-2, p.89-97, 2003.

NAVASUMRIT, P. et al. Ethanol-Induced Free Radicals and Hepatic DNA Strand Breaks are Prevented *in vivo* by Antioxidants: Effects of Acute and Chronic Ethanol Exposure. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, no. 1, p. 93-99, Jan. 2000.

NIETO, N.; FRIEDMAN, S. L. CEDERBAUM, A. I. Stimulation and Proliferation of Primary Rat Hepatic Stellate Cells by Cytochrome P450 2E1-Derived Reactive Oxygen Species. **Hepatology**, Baltimore, v.35, no. 1, p. 62-73, 2002.

ODELEYE, O. E. et al. Vitamin E protection against nitrosamine-induced esophageal tumor incidence in mice immunocompromised by retroviral infection. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 13, no.10, p. 1811-1816, Oct. 1992.

OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J.; RICE, P. Effect of Alcohol on the Oral Mucosa Assessed by Quantitative Cytomorphometry. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 28, no. 5, p. 216-220, May 1999.

PARI, L.; SURESH, A. Effect of grape (*Vitis vinifera* L.) leaf extract on alcohol induced oxidative stress in rats. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 46, no. 5 p.1627-1634, May 2008.

ROTHMAN, K.J. Epidemiology of head and neck cancer. **Laryngoscope**, Saint Louis, v. 88, no. 3, p. 435-438, Mar 1978.

RÜSCHOFF, J. et al. Evaluation of Nucleolus Organizer Regions (NORs) by Automatic Image Analysis: a Contribution to Standardization. **J. Pathol.**, Chinchester, v. 161, no. 2, p. 113-118, June 1990.

SANFELICE, J. C. **Alterações Morfológicas em Epitélio Lingual de Camundongos Expostos ao Álcool Etílico a 40° GL.** 2001, 67f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Área de Concentração Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SADRZADEH S.M., et al. High-dose vitamin E supplementation has no effect on ethanol-induced pathological liver injury. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, Baltimore, v. 273, no. 1, p. 455-460, Apr 1995.

SCOTT, R. J. et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. **J. Pathol.**, Chinchester, v. 165, no. 2, p. 173-178, Oct. 1991.

SIRRI, V. et al. Amount of the Two Major Ag - NOR Proteins, Nucleolin, and Protein B23 is Cell - Cycle Dependent. **Cytometry**, Baltimore, v. 28, no. 2, p. 147-156, June 1997.

SIRRI, V; ROUSSEL, P; HERNANDEZ - VERDUN, D. The AgNOR Proteins: Qualitative and Quantitative Changes During the Cell Cycle. **Micron**, Oxford, v. 31, no. 2, p. 121-6, Apr. 2000.

THOMSON, A. D. Alcohol and Nutrition. **Clin. Endocrinol. Metab.**, London, v. 7, no. 2, p. 405-428, July 1978.

TOSCHI, I.; BRAVO, R. Changes in Cyclin/Proliferating Cell Nuclear Antigen Distribution During DNA Repair System. **J. Cell. Biol.**, New York, v. 107, no.5, p.1623-1628, Nov. 1988.

VALENTINE, J. A. et al. A Histological Analysis of the Early Effects of Alcohol and Tobacco Usage on Human Lingual Epithelium. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 14, no. 8, p. 654-665, Sept. 1985.

VINCON, P. et al. Inhibition of Alcohol-Associated Colonic Hyperregeneration by α -Tocoferol in the Rat. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, Oxford, v. 27, no. 1, p. 100-106, Jan. 2003.

WARNAKULASURYIA, S. et al. Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. **J. Oral Pathol. Med.** Copenhagen, v. 37, no.3, p. 157-165, Mar 2008.

WIGHT A.J., OGDEN, G. R. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer--a review. **Oral Oncol.**, Oxford, v.34, no. 6, p. 441-447, Nov. 1998.

WU, D.; CEDERBAUM, A. I. Alcohol, Oxidative Stress, and Free Radical Damage. **Alcohol Res. Health**, Pittsburgh, v. 27, no.4, p. 277-284, 2003.

WYNDER, E. L.; MUSHINSKI, M. H.; SPIVAK, J. C Tobacco and alcohol consumption in relation to the development of multiple primary cancers. **Cancer**, Philadelphia, v. 40, no. 4 Suppl, p. 1872-1878, Oct. 1977.

YU, B.P. Cellular Defense Against Damage from Reactive Oxygen Species. **Physiol. Rev.**, Baltimore, v. 74, no. 1, p. 139-162, Jan. 1994.

ZHOU, Z. ; SAN, X. ; KANG, Y. J. Metallothionein Protection Against Alcoholic Liver Injury Through Inhibition of Oxidative Stress. **Exp. Biol. Med.**, Maywood, v. 227, no. 3, p. 214-222, Mar. 2002.