

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

FERNANDA FRIEDRICH

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA EXPRESSÃO
DE ALDH3A1 NO EPITÉLIO LINGUAL DE RATOS
SUBMETIDOS AO CONSUMO CRÔNICO DE ÁLCOOL

Porto Alegre

2017

FERNANDA FRIEDRICH

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PROLIFERATIVA E DA EXPRESSÃO
DE ALDH3A1 NO EPITÉLIO LINGUAL DE RATOS
SUBMETIDOS AO CONSUMO CRÔNICO DE ÁLCOOL

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Odontologia da Faculdade de Odontologia
da Universidade Federal do Rio Grande do
Sul, como requisito parcial para obtenção do
título de Cirurgiã-Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Coelho Carrard

Porto Alegre
2017

CIP - Catalogação na Publicação

Friedrich, Fernanda

Avaliação da atividade proliferativa e expressão de ALDH3A1 no epitélio bucal de ratos submetidos ao consumo crônico de álcool. / Fernanda Friedrich. -- 2017.

13 f.

Orientador: Vinicius Coelho Carrard.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Etanol. 2. Proliferação de células. 3. Câncer bucal. I. Coelho Carrard, Vinicius, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me darem todo o apoio, incentivo, amor e condições para que eu pudesse chegar até aqui e concluir esta etapa.

Ao meu irmão Eduardo, pela companhia e amizade de vida, por estar presente, dar apoio e ser meu maior ombro amigo.

Ao meu orientador, Prof. Vinicius, pelos ensinamentos, pela paciência, dedicação e amizade, ao longo destes três anos de iniciação científica. És um exemplo de profissional e de ser humano para mim.

As minhas amigas colegas de faculdade, por fazerem estes cinco anos mais alegres, leves e inesquecíveis.

As minhas amigas de vida, por me apoiarem, incentivarem, pelos momentos felizes, pelas palavras de apoio, por dizerem o que era preciso quando necessário.

A Jéssica Strey, por ter sido uma companheira de pesquisa durante dois anos e pelo papel fundamental no presente trabalho.

Ao meu namorado, Luis Eduardo, pelo companheirismo, incentivo e por fazer estes últimos meses muito mais leves e felizes.

RESUMO

O consumo de álcool produz alterações no processo de renovação do tecido epitelial em diferentes porções do trato digestivo, o que pode, em parte, explicar a sua relação ao câncer de boca. O objetivo desse estudo observacional transversal analítico foi avaliar o efeito de diferentes períodos de consumo crônico de álcool sobre a atividade proliferativa e na expressão de ALDH3A1 no epitélio lingual. Vinte e três ratos Wistar, fêmeas foram separados nos seguintes grupos: Controle (C), n=6: animais que receberam água durante 120 dias; Álcool 60 (A60), n=10: ratos que consumiram álcool 40°GL por 60 dias e posteriormente água por mais 60 dias; Álcool 120 (A120), n=10: ratos submetidos ao consumo de álcool 40°GL por 120 dias. Após eutanásia, as línguas dos animais foram removidas cirurgicamente, fixadas em formalina e processadas para inclusão em blocos de parafina. Dois cortes histológicos de 4 µm foram obtidos a partir de cada bloco de parafina. Os cortes foram dispostos em lâminas silanizadas e submetidos à técnica imunohistoquímica para marcação do Ki67 para avaliação da atividade proliferativa e ALDH3A1 para verificar a presença de células tronco. A quantificação da imunomarcação baseou-se na quantificação do percentual de células positivas em 100 células da camada basal e 100 células da camada suprabasal. Foram avaliados os epitélios do dorso e do ventre de língua. As quantificações foram realizadas por um examinador treinado respeitando-se o cegamento. Foi detectado aumento do número de células Ki67-positivas (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$) nas diferentes camadas do epitélio do ventre de língua no mesmo tempo experimental. Observou-se aumento da frequência (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$) de células ALDH3A1-positivas nas diferentes camadas do epitélio do dorso e do ventre lingual dos animais que consumiram álcool por 120 dias. Conclui-se que o consumo de álcool por longo prazo leva ao aumento da presença de células ALDH3A1 positivas e ao aumento proliferação celular no epitélio do ventre lingual, sendo estes eventos não associados entre si.

Palavras-chave: Etanol. Proliferação de células. Metabolismo

ABSTRACT

Alcohol consumption causes changes in epithelial renewal in different portions of digestive tract. This, in part, may explain its association with oral cancer. The aim of the present transversal analytic study was to evaluate the effect of chronic alcohol consumption at different periods on the proliferative behavior and ALDH3A1 expression in the epithelial tongue. Twenty-three female Wistar rats were separated into the following groups: Control (C), n=6: animals that received water along 120 days; Alcohol 60 (A60), n=10: rats that consumed 40°GL alcohol for 60 days and then water for 60 days; Alcohol 120 (A120), n=10: rats submitted to consume of 40°GL alcohol for 120 days. After that, rats were killed and their tongues were surgically removed, fixed in formalin and paraffin embedded. Two 4µm histological sections were obtained from each block. Then, the sections were placed onto silanized slides and submitted to immunohistochemical reaction to evaluate Ki-67 and ALDH3A1. Immunolabeling quantification was based in the percentage of the positive cells in 100 epithelial cells from basal and suprabasal layers. Dorsal and ventral tongue epithelium were assessed. The analysis was performed by one single blinded examiner. It was observed an increase in the number of Ki67-positive cells in the different layers of the ventral tongue epithelium after 120 days of alcohol consumption (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$). ALDH3A1 expression increased in the different layers of ventral and dorsal tongue epithelium in the rats exposed to 120 days of alcohol consumption. Observou-se aumento da frequência (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$) de células ALDH3A1-positivas nas diferentes camadas do epitélio do dorso e do ventre lingual dos animais que consumiram álcool por 120 dias.

Keywords: Ethanol. Cell proliferation. Metabolism

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Percentual de células imunomarcadas pela proteína Ki67 no ventre lingual, camadas basal (A) e suprabasal (B).....	16
Figura 2 – Aspecto microscópico do epitélio do ventre lingual dos animais dos grupos Controle (A) e A120 (B) submetidos a imunomarcção da proteína Ki67.....	17
Figura 3 – Gráficos representando o percentual de células imunomarcadas pela proteína ALDH3A1 nas camadas basal e suprabasal do epitélio do dorso lingual.....	17
Figura 4 – Gráficos representando o percentual de células imunomarcadas pela proteína ALDH3A1 no ventre lingual, nas camadas basal e suprabasal.....	18
Figura 5 – Aspecto microscópico do epitélio do ventre lingual dos animais dos grupos Controle (A) e A120 (B) submetido a imunomarcção da proteína ALDH3A1.....	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso inicial e ganho de peso ao longo do experimento.....	16
--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	OBJETIVO.....	11
3	METODOLOGIA.....	12
3.1	ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA.....	13
3.2	QUANTIFICAÇÃO DO Ki67.....	13
3.3	QUANTIFICAÇÃO DO ALDH3A1.....	14
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	14
4	RESULTADOS.....	15
4.1	EXPRESSÃO DO Ki67.....	15
4.2	EXPRESSÃO DO ALDH3A1.....	16
5	DISCUSSÃO.....	18
6	CONCLUSÕES.....	20
	REFERÊNCIAS.....	21

1 INTRODUÇÃO

O consumo de etanol (álcool) tem aumentado em várias populações (ALMEIDA-FILHO et al., 2004; FERIGOLO et al., 2004). Diversos estudos epidemiológicos têm mostrado que o consumo de álcool é um fator de risco independente para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular, o tipo de câncer mais comum na cavidade oral (DE STEFANI et al., 1998; FIORETTI et al., 1999; FRANCO et al., 1989; LA VECCHIA et al., 1986; LECLERC et al., 1987; LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2004; WYNDER; BROSS; FELDMAN, 1957). Esta relação é ainda mais evidente quando há associação com o hábito de fumar, o que é bastante comum e torna difícil o estudo do efeito do álcool isoladamente (FRANCESCHI et al., 1990; FRANCO et al., 1989; LLEWELLYN et al., 2004; MASHBERG; GARFINKEL; HARRIS, 1981; RICH; RADDEN, 1984; ROTHMAN, 1978; WYNDER; MUSHINSKI; SPIVAK, 1977).

Contudo, o papel do álcool na carcinogênese bucal ainda é parcialmente compreendido (OGDEN; WIGHT, 1998; OGDEN; WIGHT; RICE, 1999). Estudos *in vitro* mostram que, a partir da aplicação tópica, o álcool modifica a permeabilidade da mucosa bucal, explicando, pelo menos em parte, o sinergismo entre álcool e fumo. Segundo estes estudos bebidas com concentração alcoólica entre 15% e 25% facilitariam a ação de diferentes substâncias, inclusive as carcinogênicas presentes no fumo (DU et al., 2000; HOWIE et al., 2001; SQUIER; COX; HALL, 1986). Por um mecanismo ainda desconhecido, o álcool parece impedir que as células epiteliais organizem a barreira de permeabilidade, composta principalmente de lipídios. Esta barreira tem a importante função de impedir a desidratação e a penetração de agentes externos (SQUIER; FINKELSTEIN; CATE, 2001; SQUIER; WERTZ, 1996). Além disso, é provável que a ação do fumo e do álcool sobre os outros sistemas, como o imunológico, tenha uma contribuição considerável.

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 espessura (MAIER et al., 1994; MASCRES; JOLY, 1981; SANFELICE; PADILHA; SANT'ANA, 2003; VALENTINE et al., 1985). Segundo Ogden, Wight e Rice (1999) essa redução de espessura seria o resultado do aumento da descamação celular, embora outros estudos tenham afirmado que esta decorre da redução do volume das células

epiteliais (MARTINEZ et al., 2000; MARTINEZ; MARTINEZ; WATANABE, 1998; VALENTINE et al., 1985).

Com relação ao processo de renovação do epitélio, tem sido demonstrado aumento da proliferação celular decorrente do consumo crônico de álcool (MAIER et al., 1994; HOMMAN et al., 1997; MAITO et al., 2003; CARRARD et al., 2004). Em contraste, outros autores relacionaram-no com um aumento da autólise ou morte celular (MARTINEZ et al., 2000; MARTINEZ et al., 1998; MASCRES; JOLY, 1981; SLOMIANY et al., 1998). Embora aparentemente conflitantes, esses resultados podem indicar 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 homeostase (CARRARD et al., 2004). Conclui-se, dessa forma, que o aumento da proliferação celular estaria atuando de maneira compensatória para manter a integridade do tecido epitelial. Esse aumento do ritmo de proliferação poderia favorecer a maior ocorrência de mutações e danos cumulativos, aumentando o risco para o desenvolvimento do câncer.

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 isoladamente.

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. Usualmente, o acetaldeído não provoca danos, pois é rapidamente convertido em acetato. Contudo,

em determinadas situações, como consumo excessivo ou degradação deficiente, é possível que este metabólito seja acumulado. Em tese esta situação seria preocupante, pois o acetaldeído é um metabólito tóxico capaz de provocar quebra da dupla fita de DNA e de formar complexos (adutos) com diferentes moléculas, principalmente com proteínas, comprometendo as funções celulares (BIRD; DRAPER; BASRUR, 1982; DELLARCO, 1988).

Recentemente, alguns estudos têm sugerido que, além da degradação do álcool, a ALDH, particularmente os subtipos ALDH1A1 e ALDH3A1, participam de outras funções como proteção e diferenciação celulares, podendo, inclusive, ser considerada um marcador de células tronco (ALLAHVERDIYEV et al., 2012; DOUVILLE; BEAULIEU; BALICKI, 2009; MUZIO et al., 2012). Já foram identificadas 19 isoformas da desta enzima, com diferentes localizações e funções. Dentre estas, podemos destacar: proteção celular, e degradação de xenobióticos (MUZIO, 2012, LINDAHL, 1992). A ALDH, em particular o subtipo ALDH3A1 foi demonstrada em diferentes tecidos extra-hepáticos, por exemplo, epitélio do estômago, do esôfago, mama, glândulas salivares e da pele (MA; ALLAN, 2011). Contudo, apenas um estudo avaliou a presença desta proteína no epitélio bucal (DONG et al., 1996). onde o silenciamento do RNA da ALDH3A1 suprimiu a capacidade proliferativa do epitélio (KATO et al., 2013). Kato et al. (2013) sugerem que a expressão citoplasmática desta enzima indica ação antioxidante, como o observado no epitélio da córnea de mamíferos (ESTEY et al., 2007; MARCHITTI et al., 2011).

Pappa et al. (2003), identificaram a ALDH3A1 na córnea, onde atua como enzima antioxidante e absorve radiação UV. Essa enzima também foi localizada ao longo da progressão de tumores gástricos, com aumento progressivo da sua expressão entre tecido normal, displásico e neoplásico. Paralelo a isso, também foi encontrada uma diminuição da expressão de E-caderina e aumento da expressão de vimentina, sugerindo uma possível participação na transição epitélio-mesênquima (WU, 2016).

Diante do que foi exposto, é possível que a modulação da ALDH3A1 no epitélio bucal possa explicar o aumento da proliferação neste tecido.

2 OBJETIVO

O objetivo desse estudo observacional transversal analítico foi avaliar o efeito de diferentes períodos de consumo crônico de álcool sobre a atividade proliferativa e na expressão de ALDH3A1 no epitélio lingual.

3 METODOLOGIA

O estudo foi do tipo experimental, controlado e cego. Vinte e seis ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia, Mammalia da linhagem Wistar), fêmeas, com aproximadamente 3 meses de idade, pesando entre 190 e 260g e mantidos em biotério convencional com temperatura controlada ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$), umidade relativa entre 50% e 60%, ventilação adequada e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada padrão para roedores (Nuvilab/CR1, Nuvital Nutrientes LTDA, Colombo, Paraná, Brasil) ao longo de todo estudo. O estudo foi avaliado e aprovado pela Comitê de Pesquisa com Uso de Animais local (protocolo número 190/05).

Previamente ao início do estudo, os animais foram pesados e estratificados por peso conforme grupo experimental. Cada animal recebeu uma marcação em seu rabo (numeração) com caneta permanente e as caixas foram identificadas de acordo com o grupo experimental. Os animais foram divididos em 3 grupos conforme segue:

-Grupo 1 (Controle), n=6: água *ad libitum* durante 120 dias.

-Grupo 2 (ALC 60), n=10: álcool (40% v/v) *ad libitum* na água de abastecimento durante 60 dias e água por 60 dias.

-Grupo 3 (ALC 120), n=10: álcool (40% v/v) *ad libitum* na água de abastecimento durante 120 dias.

A concentração de álcool 40% foi escolhida por ser a concentração presente na “cachaça”, tipo bebida mais consumida pela população brasileira (NEVES; BORGES; VILELA, 1989). Durante a primeira semana, a concentração de álcool foi aumentada gradualmente de 5 para 40% (MCMILLEN et al., 2005). Após 60 dias, esta solução foi gradualmente substituído por água ao longo de uma semana. Depois de 120 dias, os animais foram submetidos à eutanásia por asfixia em câmara de CO_2 , e tiveram as suas línguas removidas cirurgicamente. O método utilizado foi asfixia em câmara de CO_2 em sala diferente da utilizada para manutenção dos animais. Três animais foram perdidos ao longo do experimento, sendo 2 do grupo controle e 1 do ALC120.

3.1 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Cortes histológicos de 4µm, em lâminas silanizadas, foram desparafinizados em estufa a 60°C por 12 horas, seguidas por banhos em xilol e hidratação em álcool. As lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% em metanol para bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica e então incubados com os anticorpos primários anti-Ki-67 (MIB1, DAKO, Solução de baixo pH em estufa por 18h, 1:50, overnight), anti-ALDH3A1(ab76976, Abcam, Solução de recuperação pH 6.0 por 20 min, 1:200, overnight) com reatividade para ratos. Posteriormente, os cortes foram incubados com o diaminobenzidina (DakoCytomation, Carpinteria, CA, 133USA) e contracolorados com hematoxilina de Mayer. Os controles positivos foram, respectivamente carcinoma espinocelular e esôfago. Os controles negativos foram obtidos pela substituição dos anticorpos primários por albumina sérica bovina (BSA) a 1% diluída em tampão TRIS-HCl, pH 7,4.

Imagens de todos os campos microscópicos de cada lâmina foram capturadas com o auxílio de uma câmera (QColor5, Coolet,RTV,Olympus Latin America, Inc., Miami, Florida, USA) conectada a um microscópio de luz transmitida convencional (modelo CX 41, Olympus Latin America, Miami, Florida, USA) acoplado a um computador (Dimension 5150, Dell, Porto Alegre, RS,Brasil). Foram consideradas positivas todas as células marcadas em marrom, independente da sua intensidade. As avaliações imunoistoquímicas foram realizadas por 1 examinador treinado e cego.

3.2 QUANTIFICAÇÃO DO KI-67

Para cada lâmina marcada com Ki-67 foi registrado o percentual de células positivas na camada basal e na camada suprabasal, sendo analisadas 100 células por camada, compreendendo a aproximadamente 10 campos microscópicos de 400x de magnificação (FRACALOSSI et al., 2011). Foram consideradas da camada basal as células em contato com a membrana basal. A camada suprabasal foi composta pelas duas ou três camadas de células acima da camada basal, exceto as células da camada superficial (GONZALEZ-MOLES et al., 2000).

3.3 QUANTIFICAÇÃO DO ALDH3A1

A avaliação da imunomarcagem com ALDH3A1 foi realizada nos mesmos epitélios (dorso e ventre lingual), com os mesmos números e camadas descritas acima para o Ki-67. As marcações para citoplasma e para núcleo foram avaliadas independentemente. Os diferentes sítios (dorso e ventre lingual) foram escolhidos por representarem, respectivamente, regiões com baixo e alto risco para o desenvolvimento do câncer de boca.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição dos dados relacionados a cada um dos marcadores foi avaliada a partir da aplicação do teste de Shapiro-Wilk. Como os dados mostraram distribuição normal ($p > 0,05$), utilizou-se o teste da Análise da Variância (ANOVA) para comparação dos grupos. Quando a diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) o teste de Tukey foi empregado para comparações múltiplas. As análises foram realizadas no programa PASW 18.0.

4 RESULTADOS

O peso dos animais ao final do estudo e o ganho de peso ao longo do experimento, usado para controle do estado orgânico dos animais, não mostrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Tabela 1).

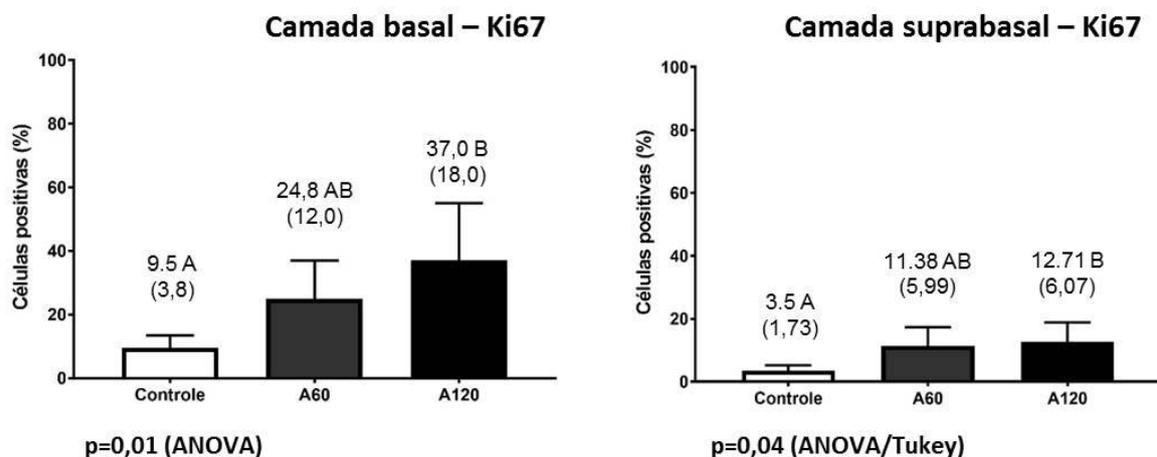
Tabela 1 - Peso inicial e ganho de peso ao longo do experimento.

	Peso (g)			Ganho de peso (%)		
	Média	DP	p	Média	DP	p
Controle (C)	247,25	17,97	0,33	8,80	3,19	0,72
Álcool – 60 dias (A60)	238,10	22,65		5,00	1,84	
Álcool – 120 dias (A120)	228,67	18,95		2,77	9,80	

4.1 EXPRESSÃO DO KI67

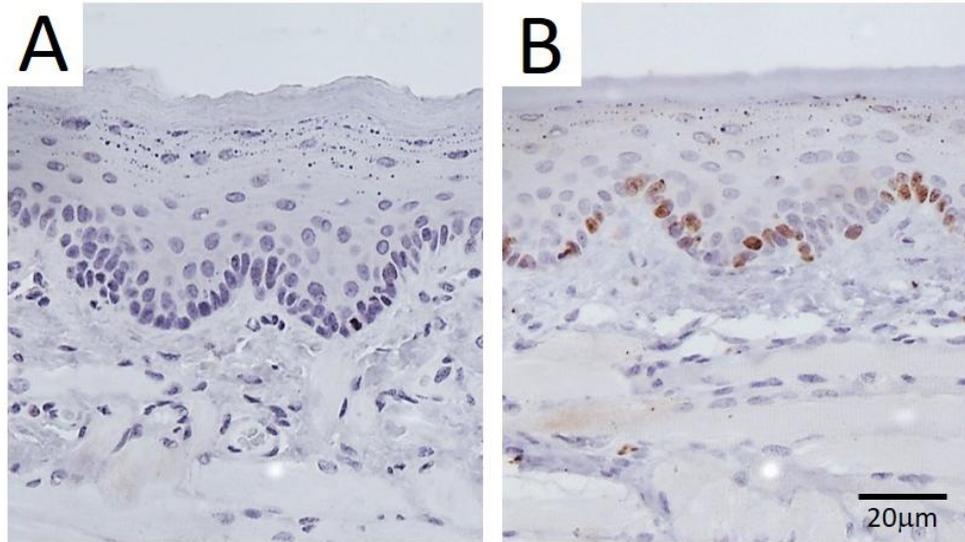
No epitélio do dorso lingual, em ambas as camadas (basal e suprabasal), não houve diferenças na proliferação celular entre os grupos (ANOVA, $p = 0,89$ e $p = 0,06$ respectivamente). A proliferação celular aumentou após 120 dias de consumo de álcool quando comparado ao grupo controle, tanto na camada basal quanto na camada suprabasal do epitélio do ventre lingual (Figura 1). Imagens representativas destes grupos são apresentadas na Figuras 2A e 2B.

Figura 1 - Percentual de células imunomarcadas pela proteína Ki67 no ventre lingual, camadas basal (A) e suprabasal (B).



Fonte: da autora, 2017.

Figura 2 - Aspecto microscópico do epitélio do ventre lingual dos animais dos grupos Controle (A) e A120 (B) submetidos a imunomarcção da proteína Ki67.

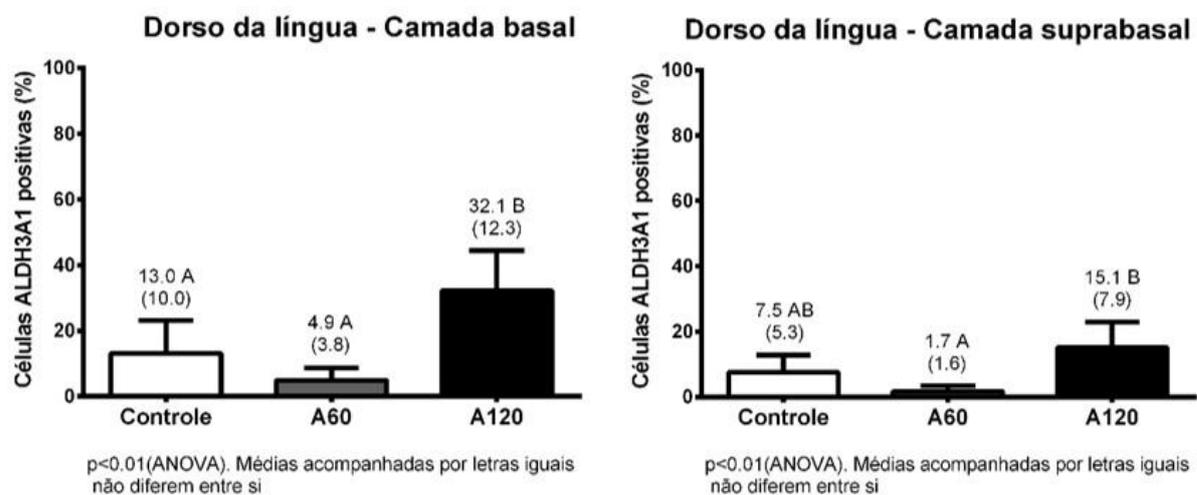


Fonte: da autora, 2017.

4.2 EXPRESSÃO DA ALDH3A1

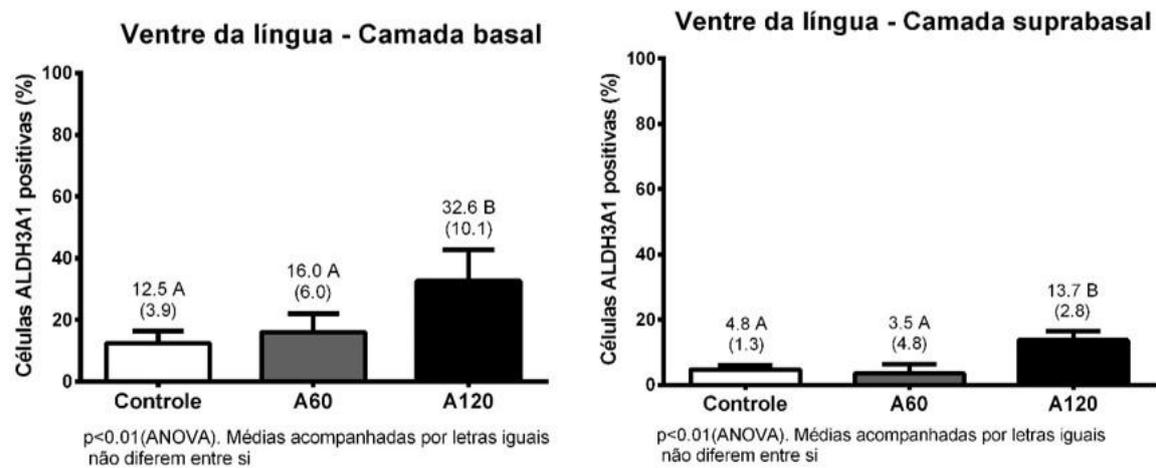
Não observou-se marcação citoplasmática nas células epiteliais em nenhum dos grupos. Tanto no epitélio do dorso quanto no epitélio do ventre lingual, houve maior frequência de células com imunomarcção nuclear no grupo A120 nas camadas basal e suprabasal em comparação aos outros grupos (FIGURAS 3 E 4). Imagens representativas são apresentadas na Figura 5.

Figura 3 - Gráficos representando o percentual de células imunomarcadas pela proteína ALDH3A1 nas camadas basal e suprabasal do epitélio do dorso lingual.



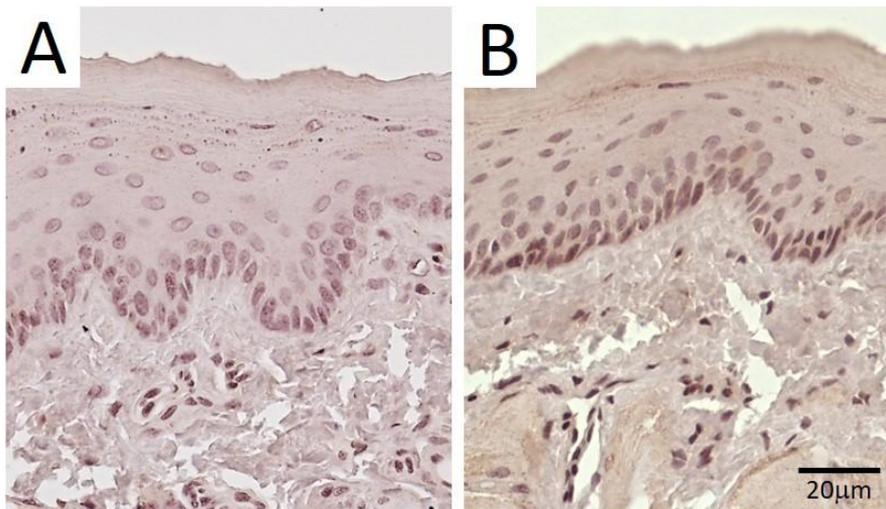
Fonte: da autora, 2017.

Figura 4 - Gráficos representando o percentual de células imunomarcadas pela proteína ALDH3A1 no ventre lingual, nas camadas basal e suprabasal.



Fonte: da autora, 2017.

Figura 5 - Aspecto microscópico do epitélio do ventre lingual dos animais dos grupos Controle (A) e A120 (B) submetido a imunomarcção da enzima ALDH3A1.



Fonte: da autora, 2017.

5 DISCUSSÃO

Ainda álcool seja reconhecidamente um fator de risco independente para o câncer de boca (FRANCO et al., 1989; FIORETTI et al., 1999; LLEWELLYN et al., 2004), os mecanismos para explicar essa relação ainda não foram completamente elucidados (CARRARD et al., 2008). Uma das hipóteses mais aceitas, é a de que o acúmulo de acetaldeído, metabólito tóxico capaz de provocar a quebra da dupla fita de DNA e de formar adutos com diferentes macromoléculas (BIRD et al., 1982; DELLARCO, 1989; SUMAN et al., 2016) possa estar envolvido. Diante disso, avaliar o metabolismo do álcool poderia ser uma forma de entender os seus efeitos nos diferentes tecidos. Estudos anteriores já haviam evidenciado a presença do ALDH3A1 em outras partes do trato gastrointestinal (MA; ALLAN, 2011; MUZIO et al., 2012), mas apenas um estudo havia demonstrado a expressão da enzima ALDH no epitélio lingual e gengival (DONG et al., 1996). Isso mostra tanto que o álcool pode ser metabolizado fora do fígado, quanto a possibilidade de modulação de enzimas relacionadas a sua degradação.

Este estudo é o primeiro a investigar a influência de diferentes tempos de consumo de álcool na expressão da ALDH e sua possível repercussão no comportamento proliferativo deste tecido. A ALDH3A1 é considerada uma enzima de fase II no metabolismo do álcool, pois sua função é degradar o acetaldeído produzido após a oxidação do etanol (álcool) pela álcool-desidrogenase (ADH). Os resultados do presente estudo mostraram diminuição da expressão da ALDH aos 60 dias de tratamento com álcool e aumento aos 120 dias. Isso poderia ser explicado por uma ação tóxica sobre a enzima, o que já havia sido demonstrado com relação a enzima superóxido-dismutase em um estudo anterior com o mesmo material (CARRARD et al., 2013). Em relação a esse aspecto, é importante lembrar que o consumo de álcool aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo no fígado (HALLIWELL, 1991; WU; CEDERBAUM, 2003). Por outro lado, aos 120 dias, houve o aumento da expressão da enzima, o que pode ser interpretado como mecanismo adaptativo de proteção para evitar o acúmulo de acetaldeído.

A maior parte dos estudos enfoca na expressão citoplasmática do ALDH (WU et al., 2012; MA, 2011), a qual não foi identificada no presente estudo. Poucos

estudos (PAPPA et al., 2005; BLACK; VASILIOU, 2009; MA, 2011) mencionam marcação nuclear e sugerem que a mesma possa estar relacionada à regulação do ciclo celular (PAPPA et al., 2005). Outra hipótese é que a translocação do ALDH para o núcleo esteja relacionada a regulação de genes relacionados a mecanismos de proteção celular. Considerando que o seu substrato (acetaldeído) é mutagênico, estes genes poderiam ser os relacionados ao reparo de DNA. Estudos futuros deveriam focar na investigação desta hipótese, pois, com base nos resultados obtidos pelo presente estudo, não se pode assegurar que todo o acetaldeído foi degradado.

O aumento progressivo da proliferação celular observado no epitélio do ventre lingual já havia sido demonstrado em estudos anteriores do nosso grupo (CARRARD et al., 2004; CARRARD et al., 2013; MAITO et al., 2003). Este estudo teve como foco o epitélio lingual, pois é um dos sítios mais acometidos pelo câncer bucal (TURATI, et al. 2010). É sabido que o aumento da proliferação celular é um dos eventos observados ao longo da carcinogênese bucal (HILDEBRAND et al., 2010). Diversos estudos mostram que a ALDH3A1 pode ser uma das vias para estimular proliferação celular (MUZIO et al., 2012; MOREB et al., 2008; CANUTO et al., 2001; PAPPA et al., 2005). Contudo, essa via não parece estar envolvida neste contexto, pois observou-se aumento da proliferação celular apenas no epitélio do ventre, enquanto a ALDH3A1 mostrou aumento tanto no epitélio do dorso quanto no ventre de língua. De qualquer forma, o aumento da proliferação celular pode ser o primeiro passo na carcinogênese bucal, tendo em vista que células que apresentam turnover mais rápido são mais suscetíveis a erros de duplicação do DNA (MELNICK et al., 1993; TOMATIS, 1993). Este efeito do álcool pode ser uma resposta adaptativa que induz aumento da descamação ou o início da carcinogênese, provavelmente relacionada ao acúmulo de acetaldeído, o que não pode ser avaliado neste estudo.

6 CONCLUSÕES

O consumo crônico de álcool induz aumento da proliferação celular e da expressão da ALDH3A1 no epitélio lingual, mas estes eventos não estão relacionados entre si. Mais estudos são necessários para avaliar o efeito do consumo de álcool sobre dano de DNA e nos seus mecanismos de reparo.

REFERÊNCIAS

- ALLAHVERDIYEV, A. M. et al. Aldehyde Dehydrogenase: Cancer and Stem Cells. In: CANUTO, R. A. (Ed.). **Biochemistry, Genetics and Molecular Biology**. [S.l.]: InTechOpen, 2012. p. 4-28.
- ALMEIDA-FILHO, N. et al. Alcohol drinking patterns by gender, ethnicity, and social class in Bahia, Brazil. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 45-54, Feb. 2004.
- BIRD, R. P.; DRAPER, H. H.; BASRUR, P. K. Effect of malonaldehyde and acetaldehyde on cultured mammalian cells. Production of micronuclei and chromosomal aberrations. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 101, no. 3, p. 237-246, May 1982.
- CANUTO, R. A. et al. The effect of a novel irreversible inhibitor of aldehyde dehydrogenases 1 and 3 on tumour cell growth and death. **Chem. Biol. Interact.**, Amsterdam, v.130–132, no. 1-3, p.209–218, Jan. 2001.
- CARRARD, V. C. 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.
- CARRARD, V. C. et al. Effects of acute alcohol consumption and vitamin E co-treatment on oxidative stress parameters in rats tongue. **Food Chem. Toxicol.**, Oxford, v. 47, no. 6, p. 1058–1063, June 2009.
- CARRARD, V. C. et al. Exploring the mechanisms of alcohol-related damage in oral mucosa – is oxidative stress associated with the increase in cell proliferation in rat tongue epithelium? **Pharm. Biol.**, Lisse, v. 51, no. 2, p. 160–169, Feb. 2013.
- CLASSEN, W. Behavioral, neurology and electrophysiology. In: KRINKE, G. J. (Ed.). **The laboratory rat**. [S.l.]: Elsevier, 2000. cap. 21, p.419-435.
- DE STEFANI, E. et al. Hard liquor drinking is associated with higher risk of cancer of the oral cavity and pharynx than wine drinking. **Oral Oncol.**, Amsterdam, v. 34, no. 2, p. 375-378, Mar. 1998.
- DELLARCO, V. L. A mutagenicity assessment of acetaldehyde. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 195, no. 1, p. 1-20, Jan. 1988.
- DONG, Y. J.; PENG, T. K.; YIN, S. J. Expression and activities of class IV alcohol dehydrogenase and class III aldehyde dehydrogenase in human mouth. **Alcohol**, New York, v. 13, no. 3, p. 257-262, May/June 1996.
- DOUVILLE, J.; BEAULIEU, R.; BALICKI, D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. **Stem Cells Dev.**, Larchmont, v. 18, no. 1, p. 17-25, Jan./Feb. 2009.

DU, X. et al. Penetration of N-nitrosomonicotine (NNN) across oral mucosa in the presence of ethanol and nicotine. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, no. 2, p. 80-85, Feb. 2000.

ESTEY, T. et al. ALDH3A1: a corneal crystallin with diverse functions. **Exp. Eye Res.**, London, v. 84, no. 1, p. 3-12, Jan. 2007.

FERIGOLO, M. et al. Drug use prevalence at FEBEM, Porto Alegre. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 10-16, mar. 2004.

FIORETTI, F. et al. Risk factor for oral pharyngeal cancer in never smokers. **Oral Oncol.**, Amsterdam, v. 35, no. 4, p. 375-78, June 1999.

FRACALOSSO, A. C. et al. Ras gene mutation is not related to tumour invasion during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **J. Oral Pathol. Med.**, Oxford, v. 40, no. 4, p. 325-333, Apr. 2011.

FRANCESCHI, S. et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in Northern Italy. **Cancer Res.**, Baltimore, v.50, no. 20, p. 6502-6507, Oct. 1990.

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, June 1989.

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, June 1989.

FIORETTI, F.; et al. Risk factor for oral pharyngeal cancer in never smokers. **Oral Oncol.**, Amsterdam, v. 35, no. 4, p. 375-378, July 1999.

GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. **Head Neck**, New York, v.22, no.7, p. 658-661, Oct. 2000.

HALLIWELL, B., Drug antioxidant effects: a basis for drug selection?. **Drugs**, New York, v. 42, no. 4, p. 569–605, Oct. 1991.

HILDEBRAND, L.D.; et al. Evaluation of cell proliferation rate in non-dysplastic leukoplakias. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, Valencia, v. 15, no. 2, p. 328-334, Mar. 2010.

HOMANN, N., et al. Effects of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v. 89, no. 22, p. 1692–1697, Nov. 1997.

HOWIE, N. et al. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. **Oral Dis.**, Copenhagen, v. 7, no. 6, p. 349-354, Nov. 2001.

KATO, H. et al. Distinct expression patterns and roles of aldehyde dehydrogenases in normal oral mucosa keratinocytes: differential inhibitory effects of a pharmacological inhibitor and RNAi-mediated knockdown on cellular phenotype and

- epithelial morphology. **Histochem. Cell Biol.**, Berlin, v. 139, no. 6, p. 847-862, June 2013.
- LA VECCHIA, C. et al. Mortality from alcohol related disease in Italy. **J. Epidemiol. Community Health**, London, v. 40, no. 3, p. 257-261, Sept. 1986.
- LECLERC, A. et al. Type of alcoholic beverage and cancer of the upper respiratory and digestive tract. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, Oxford, v. 23, no. 5, p. 529-534, May 1987.
- LLEWELLYN, C. D.; 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.**, Oxford, v. 33, no. 9, p. 525-532, Oct. 2004.
- MA, I.; ALLAN, A. L. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. **Stem Cell Rev.**, Copenhagen, v. 7, no. 2, p. 292-306, June 2011.
- MAHER, J. J. Exploring alcohol's effects on liver function. **Alcohol Health Res. World**, Rockville, v. 21, no. 1, p. 5-12, 1997.
- 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. 387-397, Apr. 1994.
- MAITO, F. L. D. M. 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.
- MARCHITTI, S. A. et al. Ultraviolet radiation: cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes. **Eye Contact Lens**, Hagerstown, v. 37, no. 4, p. 206-213, July 2011.
- MARTINEZ, M. et al. Morphological effects on the hard palatine mucosa of calomys callosus submitted to experimental chronic alcoholism. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Siena, v. 34, no. 1, p. 77-83, Jan. 2000.
- MARTINEZ, M.; MARTINEZ, F.; WATANABE, I. Morphological changes on the hard palatine mucosa of rats (*Rattus Norvegicus Albinus*) after chronic alcohol consumption. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, Siena, v. 30, no. 3, p. 379-384, July 1998.
- MASCRES, C.; JOLY, J. Histochemical and ultrastructural study of the rat oral mucosa, after chronic administration of alcohol. **J. Biol. Buccale**, Paris, v. 9, no. 3, p. 279-295, Sept. 1981.
- MASHBERG, A.; GARFINKEL, L.; HARRIS, S. Alcohol as a primary risk factor in oral squamous carcinoma. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v. 31, no. 3, p. 146-155, May/June 1981.

MCMILLEN, B. A. et al. Effects of a metabotropic, mglu5, glutamate receptor antagonist on ethanol consumption by genetic drinking rats. **Alcohol Alcohol**, Oxford, v. 40, no. 6, p. 494-497, Nov./Dec. 2005.

MOREB, J. S. et al. ALDH isozymes downregulation affects cell growth, cell motility and gene expression in lung cancer cells. **Mol. Cancer**, v. 7, no. 87; Nov. 2008.

MUZIO, G. et al. Aldehyde dehydrogenases and cell proliferation. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v. 52, no. 4, p. 735-746, Feb. 2012.

NEVES, M.; BORGES, D. R.; VILELA, M. P. Concentration of ethanol on most consumed beverages in Brazil. **Gastroenterol. Endosc. Dig.**, v. 8, p. 17-20, 1989.

OGDEN, G.; WIGHT, A. Aetiology of oral cancer: alcohol. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v. 36, no. 4, p. 247-251, Aug. 1998.

OGDEN, G.; WIGHT, A.; RICE, P. Effect of alcohol on the oral mucosa assessed by quantitative cytomorphometry. **J. Oral Pathol. Med.**, Oxford, v. 28, no. 5, p. 216-220, May 1999.

PAPPA, A. et al. Human aldehyde dehydrogenase 3A1 inhibits proliferation and promotes survival of human corneal epithelial cells. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 280, no. 30, p. 27998-28006, July 2005.

RICH, A. M.; RADDEN, B. G. Squamous cell carcinoma of the oral mucosa: a review of 244 cases in Australia. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 13, no. 5, p. 459-471, Oct. 1984.

ROTHMAN, K. J. Epidemiology of head and neck cancer. **Laryngoscope**, [S.l.], v. 88, no. 3, p. 435-438, Mar. 1978.

SANFELICE, J.; PADILHA, D.; SANT'ANA, M. F. Morphological changes in epithelium of the tongue of mice exposed to 40° GL alcohol solution. **Rev. Fac. Odontol. de Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 44, n. 1, p. 3-14, jul. 2003.

SLOMIANY, B. et al. Induction of buccal mucosal apoptosis with chronic alcohol ingestion. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, London, v. 44, no. 2, p. 381-389, Feb. 1998.

SQUIER, C.; COX, P.; HALL, B. Enhanced penetration of nitrosonornicotine across oral mucosa in the presence of ethanol. **J. Oral Pathol.**, Copenhagen, v. 15, no. 5, p. 276-279, May 1986.

SQUIER, C.; FINKELSTEIN, M.; CATE, I. A. T. Mucosa bucal. In: KOOGAN, G. (Ed.). **Histologia bucal: desenvolvimento, estrutura e função**. Rio de Janeiro: [s.n.], 2001. p.323-339.

SQUIER, C.; WERTZ, P. Structure and function of the oral mucosa and implications for drug delivery. In: RATHBONE, M. J. (Ed.). **Oral mucosa drug delivery**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.1-26.

SUMAN, S. et al. Increased DNA double-strand break was associated with downregulation of repair and upregulation of apoptotic factors in rat hippocampus after alcohol exposure. **Alcohol.**, New York, v. 54, p. 45-50, Aug. 2016.

VALENTINE, J. 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.

WU, D., CEDERBAUM, A.I., Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. **Alcohol Res. Health**, Rockville, v. 27, no. 4, p. 277–284, 2003.

WYNDER, E. L.; BROSS, I. J.; FELDMAN, R. M. A study of the etiological factors in cancer of the mouth. **Cancer**, New York, v. 10, no. 6, p. 1300-1323, Nov./Dec. 1957.

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