

Instituto de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Federal de Rio Grande do Sul,
Brasil

Alteraciones de la mucosa bucal causadas por la asociación entre el tabaco y los colutorios bucales con una concentración de alcohol del 26,9 %

Anna Christina Medeiros Fossati,¹ Eduardo Pizzamiglio Kappel,² Lorenzo Dobrinsky,² José Miguel Amenabar,³ Marcelo Lazzaron Lamers² y Heloisa Emilia Dias da Silveira⁴

RESUMEN

Se analizaron el epitelio y la capa de queratina de la mucosa oral de 15 ratas que durante 45 días fueron sometidas a una aplicación tópica de picadura de tabaco y de colutorio bucal con una concentración de alcohol del 26,9 %. Tras ese período, se extrajeron las mucosas y se les realizó un análisis histológico. Se observó una significativa disminución del espesor del epitelio y de la capa de queratina, lo que indica que la picadura asociada con colutorios bucales con alta concentración de alcohol, provoca la reducción del espesor de la capa de queratina y del epitelio de la boca.

Palabras clave: mucosa bucal, tabaco, alcohol.

Varios estudios han demostrado que el alto consumo de tabaco y de alcohol se relaciona con una serie de alteraciones de la mucosa bucal.¹⁻⁶ La presencia de esas alteraciones depende de varios factores como la sensibilidad del paciente, el área expuesta, el espesor de la capa epitelial, la concentración de alcohol y el tipo de tabaco usado. Entre los tipos de tabaco, el tabaco en picadura masticable se ha considerado uno de los más nocivos, porque se mantiene en contacto con la mucosa bucal por un largo tiempo.⁷⁻⁹

La literatura médica ha mostrado la presencia de incontables sustancias irritantes en el tabaco como son las nitrosaminas que tienen grandes efectos carcinogénicos. Shklar y colaboradores,¹⁰ mostraron que la picadura masticable estimula la respuesta inmunológica y provoca un decrecimiento de la actividad mitótica del epitelio. Chen⁵ en su trabajo con ratas, observó que las membranas de la mucosa bucal sometidas a una aplicación tópica reiterada de tabaco presentaban un epitelio hiperplásico y una alta frecuencia de células binucleares, lo que indica trastornos en el proceso normal de división celular.

Otros trabajos han demostrado que el propio alcohol presenta una baja capacidad para modificar el epitelio, pero si se asocia con el consumo de tabaco, entonces el nivel de agresión a la mucosa bucal es mayor que por separado, de lo cual se desprende un efecto sinérgico entre estas sustancias.^{4,11-17} Algunas razones posibles que explicarían esta conducta pudiera ser la forma en que el alcohol actúa sobre la membrana celular, con un efecto local directo al modificar la permeabilidad de la membrana y a través de los pasos enzimáticos finales de su metabolismo como el acetaldehído.^{16,18-20} En su trabajo con la permeabilidad membranosa de las células de la mucosa bucal en cerdos,

utilizando diferentes concentraciones de alcohol, *Du* y colaboradores⁷ observaron que concentraciones de alcohol entre 25 y 30 % aumentaban la penetración de las nitrosaminas. Sin embargo, otros autores opinan que la acción del alcohol dirigida a incrementar la permeabilidad celular se debe probablemente a alteraciones moleculares en la membrana celular y no a una acción directa sobre la bicapa de lípidos.^{1,18,19}

Los antisépticos bucales se han empleado como método complementario de la higiene bucal que se recomienda a menudo a pacientes cuyos procedimientos mecánicos de higiene bucal no son los adecuados para controlar la placa dental supragingival.⁹ Existen variadas formas comerciales y algunas de ellas presentan en su composición una concentración de alcohol que gira alrededor del 25 %.⁸ Si tienen una concentración alta, ciertos colutorios pueden actuar localmente de la misma forma en que lo hacen las bebidas alcohólicas,^{17,21} y su uso continuado, cuando se asocia con el tabaquismo, podría provocar alteraciones en la membrana mucosa bucal.

Conociendo de antemano que el tabaco es en sí un agente irritante del epitelio bucal que promueve alteraciones en la membrana mucosa y la proliferación celular, sus efectos pueden aumentar cuando se asocia con el alcohol. Este último está presente en la fórmula de varios colutorios que emplean los fumadores. El objetivo de este trabajo fue analizar las alteraciones morfológicas de la mucosa bucal de ratas Wistar, sometidas a una aplicación tópica de picadura de tabaco masticable asociado con un colutorio que contiene una concentración de alcohol del 26,9 %.

MÉTODOS

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigaciones de la Escuela de Estomatología de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Brasil.

Material

Quince ratas macho Wistar de 30 días de nacidas, alimentadas con agua y alimentos sin restricción y mantenidas en un ciclo en oscuridad/ claridad de 12/12horas, fueron asignadas a 3 grupos de 5 animales cada uno:

- G1: ratas macho sometidas a la aplicación de colutorio contentivo de alcohol (26,9 %) ligado con tabaco masticable.
- G2: ratas sometidas a la aplicación de tabaco masticable en solución salina normal.
- G3: animales sometidos a la aplicación de solución salina normal.

Experimento

Se empleó un colutorio con 26,9 % de concentración de alcohol, ligado con un tabaco masticable de Copenhagen Snuff (U.S Tobacco Co.). Este producto se presenta triturado y húmedo, y posee una concentración de nicotina que oscila entre 10,32 y 10,76 mg/g, y un pH de 7,99 a 8,48.⁶ El consumo de 2 latas (68,04 g) por semana, es igual a la cantidad de nicotina absorbida en 30 cigarros consumidos por día 22 aproximadamente.

La mezcla de 18 mL de Listerine con 1,8 g de tabaco masticable, 23 así como la mezcla de tabaco masticable con solución salina normal en la misma proporción y volumen, se realizó cada 7 días.

Durante 45 días se aplicó diariamente al grupo de prueba Listerine con tabaco masticable y al grupo control solución salina normal, tras la analgesia de los animales. Se realizaba la aplicación a las 8:30 a.m. y luego se le privaba a los animales de agua y comida hasta las 4:00 p.m., cuando nuevamente se les dejaba comer e ingerir líquido a voluntad hasta las 8:30 a.m. del día siguiente.

Aplicación tópica:

- G1: 0,5 mL de Listerine con tabaco masticable en la mucosa alveolar vestibular del lado izquierdo del animal.
- G2: 0,5 mL de tabaco masticable mezclado con solución salina normal en la mucosa alveolar vestibular del lado izquierdo del animal.
- G3: 0,5 mL de solución salina normal en la mucosa alveolar vestibular del lado izquierdo de la rata.

Las mezclas se agitaban antes de aplicarse con la ayuda de una jeringuilla de insulina sin aguja y con la punta hendida. El animal se colocaba en decúbito lateral.

Todos los días se realizaba una inspección visual a los animales en cuanto al aspecto clínico de la mucosa y se recopilaban las observaciones.

Luego de 45 días de experimento, se sacrificaron las ratas y se les extrajo la mucosa oral del surco vestibular. Se fijaron las mucosas extraídas en formalina al 10 %, amortiguada con fosfato 0,1M durante 24 horas a una temperatura de 4 ° C. Transcurrido este tiempo, se procesaron para los análisis histológicos y se colorearon con hematoxilina-eosina.

Análisis

Se realizaron 3 cortes en cada mucosa. Se eligieron 3 áreas de cada corte en forma secuencial y estandarizada. Se capturaron las áreas con una cámara digital (Olympus® (V-PMTVC, Tokio, Japón) acoplada con un microscopio óptico (Olympus® AX-70, Tokio, Japón) y se analizaron mediante un *software* para análisis de imágenes Image-pro Plus® 4.0 (Cybernetics®, Carlshad, USA) con una amplificación de 40x. El área completa del epitelio (EP) (sin queratina) y la capa de queratina (CQ) se midieron en cada imagen, se hallaron los valores promedio para cada grupo y se compararon con el análisis de la varianza y la prueba *post hoc* Tukey, apoyándose en el *software* SPSS 10.0.

RESULTADOS

Análisis descriptivo:

Al final de los 45 días de experimento, no se identificaron alteraciones clínicas en la mucosa oral. En la observación al microscopio no se hallaron alteraciones en el epitelio.

Análisis cuantitativo:

La figura y tabla muestran el análisis de las medias derivadas de las mediciones realizadas al EP en cada grupo, lo que demuestra una disminución significativa ($p < 0,05$) en el G1 en comparación con el G3. En el análisis de las medias de CQ se verificó una reducción significativa ($p < 0,01$) en el G1 si se compara con el G3. En ambas mediciones no se comprobó una diferencia significativa entre G3 y G2, ni entre G1 y G2.

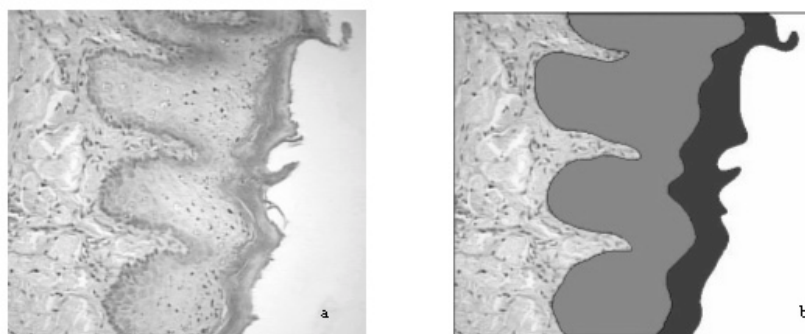


Figura. Medición del área que comprende el epitelio y la capa de queratina.

- Fotomicrografía de la mucosa bucal coloreada con HE, 40X.
- El área del epitelio (EP) y la capa de queratina (CQ) se muestran en gris claro y oscuro, respectivamente.

Tabla. Análisis de la medición del espesor de las capas de queratina y del epitelio sin queratina del GC, G1 y G2 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$)

	Grupos medición	Grupos diferencia
	G1	G3/G2
Epitelio	G2	G2/G1
	G3 G	3/G1
	G1	G3/G2
Queratina	G2	G2/G1
	G3	G3/G1

DISCUSIÓN

En este estudio, el examen clínico de la mucosa bucal no muestra alteración alguna al final de los 45 días de aplicación tópica, a diferencia de *Berstein*,^{2,3} que notificó la aparición de la lesión a los 22 días de la aplicación tópica del Listerine en las ratas. *Summerlin* y colaboradores,²³ no observaron ninguna alteración en la mucosa tras aplicar alcohol ligado con tabaco en Hamsters durante 26 días. Esta discordancia puede deberse a las distintas metodologías empleadas por los investigadores, porque *Berstein* utilizó la aplicación tópica con rayón en la cría durante 45 minutos, mientras *Summerlin* realizó la aplicación con una jeringuilla. En el presente trabajo, empleamos el método descrito por *Summerlin*²⁵ y los resultados fueron similares.

Los análisis morfológicos de las muestras del G1, al compararlo con el G3, tuvieron un espesor menor de la CQ y del EP, a diferencia de los resultados de *Summerlin* y colaboradores.²⁵ Cuando se compararon el G3 y el G2, no hubo diferencia significativa, lo que demuestra que el tabaco masticable cuando se administra de forma separada y por corto tiempo, presenta una pequeña potencialidad toxicológica para la mucosa bucal. Cuando los resultados entre G1 y G2 con GC se compararon, pudo observarse el efecto sobresaliente de la combinación colutorio-tabaco sobre la membrana de la mucosa bucal, aún cuando la aplicación fue por poco tiempo y con una concentración de alcohol encontrada en las marcas comerciales de colutorios. Aunque no se observó ninguna alteración clínica, fue posible identificar un significativo decrecimiento de la capa del espesor de la capa de queratina y del epitelio, algo que no sucede en el grupo solo expuesto al tabaco. Los resultados mostraron que el G3 y el G2 no presentaron diferencias significativas, a diferencia del G3 y el G1, lo que sugiere que el período experimental no fue suficiente como para estimular las alteraciones significativas en el G2, si bien no puede decirse que no hubo influencias en el metabolismo de las células.

Howie y colaboradores,¹⁸ en su trabajo con humanos, observaron que la mucosa de la superficie ventral de la lengua no expuesta a la concentración de etanol al 15 % por una hora, presentaba una pérdida sustancial de células de la capa superficial, lo que resultaba en un epitelio más fino. Además, observaron un aumento significativo en la permeabilidad de esta membrana mucosa. La razón de este hallazgo sería probablemente que el alcohol provocaría una ruptura de la distribución normal de la bicapa de lípidos, facilitando la penetración de las sustancias nocivas hacia el interior del epitelio. Según los autores, el alcohol sería un disolvente de las bicapas de lípidos, pero actuaría en la restructuración de las moléculas lípidas al abrir vías alternativas hacia la capa basal.^{1,17,21} Sin embargo, el mecanismo implicado en el proceso del daño tisular todavía no está esclarecido.

Una posible explicación de los resultados encontrados en este estudio, sería el hecho de que la concentración de alcohol del colutorio aumentaría la penetración de los componentes del tabaco hacia el interior de las células epiteliales, como observaron *Du* y colaboradores,⁷ en su estudio con diferentes concentraciones de alcohol y de nitrosaminas. Se cree que los componentes nocivos presentes en el tabaco podrían causar alteraciones en el ciclo celular, modificando el mecanismo de la proliferación celular y comprometiendo la diferenciación celular.^{9,24,25} Esto justificaría la disminución del epitelio y de la capa de queratina porque la queratinización es el grado máximo de diferenciación celular. *Maier* y colaboradores²⁶ observaron los efectos tóxicos del etanol y/o de su metabolito acetaldehído en la mucosa bucal de las ratas. En su trabajo demostraron que en las ratas que consumen etanol, el tamaño de los núcleos de las células basales de la mucosa bucal proveniente del suelo de la boca, el borde y la base de la lengua, se agrandaron significativamente, y que el espesor promedio epitelial de la mucosa del suelo de la boca se redujo de manera sustancial. Estos hallazgos indican que el consumo crónico de etanol provoca una atrofia asociada con la hiperregeneración.

Este trabajo sugiere que los colutorios comerciales con altas concentraciones de alcohol pueden tener efectos similares a los de las bebidas alcohólicas cuando se asocia con el consumo de tabaco, y su uso de forma reiterada por los fumadores activos tiene que observarse con cuidado, porque la asociación del alcohol y el tabaco, se considera un factor de riesgo para el desarrollo de alteraciones de la mucosa bucal. Es necesario entonces realizar más estudios que empleen los colutorios con tabaco y marquen la

hiperregeneración de las células epiteliales para explicar mejor los fenómenos envueltos en esta asociación, así como su acción sobre el epitelio bucal.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Laboratorio de Envejecimiento Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas del Hospital Sao Lucas PUC-RS, Brasil, por permitirnos el uso de sus equipos.

SUMMARY

Alterations of the oral mucous membrane caused by the association between tobacco and the mouthwashes with an alcohol concentration of 26.9 %

The epithelium and the keratin layer of the oral mucous membrane of 15 rats that were subjected to a topical application of cut tobacco and mouthwashes with an alcohol concentration of 26.9 % during 45 days were analyzed. After that period, the oral mucous membranes were removed and a histological analysis was made. It was observed a significant decrease of the thickness of the epithelium and of the keratin layer, which shows that cut tobacco associated with collutories with a high concentration of alcohol causes the reduction of the thickness of the keratin layer and of the mouth epithelium.

Key words: Oral mucous membrane, tobacco, alcohol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Axford SE, Ogden GR, Stewart AM, Saleh HA, Ross PE, Hopwood D. Fluid Phase endocytosis within buccal mucosal cells of alcohol misusers. *Oral Oncol* 1999;35:86-92.
2. Berstein ML, Carlish R, Louisville K. The induction of hyperkeratotic white lesions in hamster cheek pouches with mouthwash. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1979;48(6):517-22.
3. Berstein ML, Louisville K. Oral mucosal white lesions associated with excessive uses of listerine mouthwash. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;46(6):781-5.
4. Boffetta P, Mashberg A, Winkelmann R, Garfinkel L. Carcinogenic effect of tobacco smoking and alcohol drinking on anatomic sites of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 1992;52(04):530-3.
5. Chen SY. Effects of smokeless tobacco on the buccal mucous of HMT rats. *J Oral Pathol Med* 1989;18:08-12.
6. Determination of nicotine, ph, and moisture content of six U.S. commercial moist snuff products – Florida, January-February, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep Atlanta* 1999;48(19):398-401.
7. Du X, Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Penetration of N-nitrosornicotine (NNN) across mucous oral in the presence of ethanol and nicotine. *J Oral Pathol Med* 2000;29:80-5.
8. Esposito EJ, Gray WA. Effect of water and mouthwashes on pH of oral mucous monkey. *Pharmacol Ther Dent* 1975;2:33-41.

9. Fine DH, Furgang D, Barnett ML, Drew C, Steinberg L, Charles CH, Vincent JW. Effect of an essential oil-containing antiseptic mouthrinse on plaque and salivary *Streptococcus mutans* levels. *J Clin Periodontol* 2000;27(3):157-61.
10. Shklar G, Nivkian K, Hasson M, Herbosa EG. Effects of smokeless tobacco and snuff on mucous oral of experimental animals. *J Oral Maxillofac Surg* 1985;43:80-6.
11. Freedman ABS, Shklar G. Alcohol and hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Surg* 1978;46(6):794-805.
12. Hindle I, Downer MC, Soft DR, Speight PM. Do i alcohol responsible go intra-oral cancer lives? *Oral Oncol* 2000;36:328-33.
13. Johnson NW, Warnakulasuriya KAAS. Epidemiology and aetiology of oral cancer in the United Kingdom. *Community Dent Health* 1993;10:13-29.
14. Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I. Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993;22:459-62.
15. Mackenzie J, Ah-see K, Thakker N, Sloan P, Maran AG, Birch J, Macfarlane GJ. Increasing incident of oral cancer amongst young persons: What is the aetiology? *Oral Oncol* 2000;36:387-9.
16. Ogden GR, Wight AJ. Aetiology of oral cancer: alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998;36:247-51.
17. Weaver A, Fleming SM, Smith DB. Mouthwash and oral cancer: Carcinogen or coincidence? *J Oral Surg* 1979;37:250-3.
18. Howie NM, Trigras TK, Cruchly AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short term exposure to alcohol increases the permeability of mucous oral human. *Oral Dis* 2001;7:349-54.
19. Riedel F, Gogssler V, Hörmann K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2003;17(4):543-55.
20. Wight, AS, Ogden GR. Possible mechanism by which alcohol may influence the development of oral cancer—Review. *Oral Oncol* 1998;34:441-7.
21. Morse DE, Katz RV, Pendry DG, Helford TR, Krut Chkoff DJ, Eisenberg E, Kosis DL, Kerpel S, Freedman P, Mayne ST. Mouth wash and dentures in relation on oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol* 1997;33(5):338-43.
22. Texas Department of Health. Bureau of Disease, Injury and Tobacco Prevention. Smokeless Tobacco Facts. Available in: < dontgetburned.com >. I access in: 07 ago. 2001.
23. Summerlin DJ, Dunipace A, Potter R. Histologic effect of smokeless tobacco and alcohol on the pouch mucous and organs of the Syrian hamster. *J Oral Pathol Med* 1992;21:105-8.
24. Kerdpon D, Plung H, Kietthubthaw S. Expression of P53 in oral squamous cell carcinoma and its association with risk habits in southern Thailand. *Oral Oncol* 2001;37:553-7.
25. Rodríguez T, Altieri A, Chatenold L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Levi F, Talamini R, La Vecchia C. Risk factors goes oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol* 2004;40:207-13.
26. Maier H, Weidauer H, Zoller J, Seitz HK, Flentje M, Mall G, Born IA. Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Rev* 1994;18:387-91.

Recibido: 23 marzo del 2005. Aprobado: 9 de junio del 2005.

Dra . *Anna Christina Medeiros Fossati*. Faculdade de Odontologia UFRGS, Rua Ramiro Barcelos 2492. Tel. (51) 3316-5024. e-mail: annafo@ufrgs.br

¹Instituto de Ciencias Básicas de la Salud. Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Brasil.

²Escuela de Estomatología. Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Brasil.

³Instituto de Investigaciones Biomédicas. Pontificia Universidad Católica de Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴Departamento de Cirugía y Ortopedia, Escuela de Estomatología. Universidad Federal de Rio Grande do Sul, Brasil.