

## Efeito genotóxico do etanol em células da mucosa bucal

### *Genotoxic effect of ethanol on oral mucosa cells*

Silvia Regina de Almeida Reis\*

Moysés Sadigursky\*\*

Miguel Gustavo Setúbal Andrade\*\*\*

Lívia Prates Soares\*\*\*\*

Alexandre Ribeiro do Espírito Santo\*\*\*\*

Deise Souza Vilas Bôas\*\*\*\*

**RESUMO:** O etanol é um dos agentes químicos relacionados ao desenvolvimento de neoplasias malignas bucais. Os micronúcleos são porções de cromatina que permanecem próximas ao núcleo, resultantes de mitoses aberrantes após a ação de agentes genotóxicos. Dessa forma, sua ocorrência reflete o grau de exposição celular a carcinógenos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência de micronúcleos em células esfoliadas da língua e da mucosa jugal de indivíduos dependentes químicos de etanol. A amostra constou de células esfoliadas da língua e da mucosa jugal de 40 indivíduos alcoólatras não fumantes e de 20 abstêmios de álcool e fumo. As células obtidas foram coradas pelo método de Feulgen e contracoradas pelo "Fast Green". Observou-se um aumento estatisticamente significativo da frequência de micronúcleos em células esfoliadas da língua no grupo de indivíduos expostos ao etanol em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ). A frequência de micronúcleos em células esfoliadas da mucosa jugal apresentou-se maior no grupo de indivíduos alcoólatras quando comparado ao grupo controle, porém não houve diferença estatisticamente significante ( $p > 0,05$ ). Conclui-se, portanto, que o consumo excessivo de etanol promove alterações efetivas em células da mucosa bucal, mesmo na ausência de exposição ao fumo. Tais alterações apresentam-se mais expressivas no bordo lateral de língua, um sítio mais exposto à ação de carcinógenos quando comparado à mucosa jugal.

**UNITERMOS:** Neoplasias bucais; Etanol; Micronúcleos.

**ABSTRACT:** Ethanol is one of the chemicals related to the development of oral malignant neoplasms. Micronuclei are chromatin fragments which, after aberrant mitoses, do not become included in the main nucleus. They have been used as indicators of genotoxic damage in cells exposed to carcinogens. The aim of this study was to assess the frequency of micronuclei in exfoliated cells from the tongue and buccal mucosa of alcoholic individuals. Samples were taken from the tongue and buccal mucosa of 40 alcoholic individuals who did not smoke, and from 20 alcohol and tobacco abstainers. Cells were stained with the Feulgen reaction and counterstained with Fast Green. A significant increase in the frequency of micronuclei in tongue cells was found in the group of subjects exposed to alcohol, when compared to the control group ( $p < 0.01$ ). The frequency of micronuclei in buccal mucosa cells was higher in the group of alcoholic individuals, when compared to the control group, although there was no significant difference ( $p > 0.05$ ). Our results indicate that excessive alcohol consumption may induce effective alterations on oral mucosa cells, even without exposure to tobacco. These alterations are more expressive in the tongue, which is a site more exposed to the action of carcinogens, when compared to the buccal mucosa.

**UNITERMS:** Mouth neoplasms; Ethanol; Micronuclei.

## INTRODUÇÃO

Diversos agentes influem de forma genotóxica nas células e estão relacionados aos vários estágios da carcinogênese. Com relação à cavidade bucal, o fumo tem sido descrito como o principal fator de risco no desenvolvimento de lesões malignas e pré-malignas<sup>18,24,26</sup>. O consumo de álcool, por outro lado, é citado como forte agente potencializador no desencadeamento de lesões cancerosas<sup>23</sup>. Em indivíduos que fumam, o consumo de álcool apresenta

comprovadamente um efeito sinérgico na indução de câncer bucal<sup>16,23</sup>. Porém, o efeito do álcool isoladamente na indução de lesões cancerosas parece permanecer mal esclarecido, ainda que a sua atividade mutagênica tenha sido descrita por diversos autores<sup>19,27</sup>. Os micronúcleos são porções de cromatina resultantes de mitoses aberrantes que permanecem próximas ao núcleo celular, e sua frequência tem sido utilizada para avaliar o grau de injúria genotóxica ao qual as células animais

\*Professora Doutora Adjunta do Departamento de Diagnóstico e Terapêutica da Faculdade de Odontologia; \*\*Professor Doutor Adjunto da Faculdade de Medicina; \*\*\*\*Acadêmicos do Curso de Odontologia – Universidade Federal da Bahia.

\*\*\*Professor Assistente do Curso de Odontologia da Fundação para Desenvolvimento da Ciência, Salvador - BA.

estão expostas<sup>1</sup>. Este trabalho se propõe a investigar a frequência de micronúcleos enquanto marcador biológico para exposição celular a carcinógenos, em células esfoliadas da cavidade bucal de indivíduos alcoólatras.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Seleção dos indivíduos e coleta de células esfoliadas da mucosa bucal

Antes de iniciar-se a seleção de indivíduos para a pesquisa, o projeto foi submetido à Comissão de Ética do Hospital Ana Nery, recebendo parecer favorável para o início dos trabalhos. Procedeu-se então à seleção do grupo de estudo que constou de 40 indivíduos não fumantes, dependentes químicos de etanol internados no Hospital Psiquiátrico Ana Nery, Salvador - Bahia. A entrevista foi conduzida em ambiente de total privacidade, e por meio de questionário padronizado quantificou-se o consumo semanal de etanol. Após a entrevista, foi realizada a coleta de células de descamação da mucosa jugal e do bordo lateral da língua dos indivíduos alcoólatras com o auxílio de um "cytobrush" (Canadian Medical Brush Inc., Ontário, Canadá), que foi agitado em soro fisiológico. O material foi então centrifugado a 1.500 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante desprezado, obtendo-se dessa forma um precipitado com alta concentração de células esfoliadas. Estas foram fixadas em solução metanol:ácido acético (3:1) e posteriormente transferidas para lâminas limpas, úmidas e geladas. Após secagem durante 24 horas, as lâminas contendo células esfoliadas foram submersas em solução de HCl 1 N por 30 minutos. Procedeu-se à coloração com a reação de Feulgen e a contracoloração com o "Fast Green". Em seguida, as células foram desidratadas em etanol e clarificadas em xilol. Tais procedimentos foram revistos por Stich *et al.*<sup>26</sup> (1992). As lâminas foram montadas com lamínulas, utilizando-se bálsamo do Canadá. O grupo controle foi constituído por 20 indivíduos abstê-

mios de álcool e fumo, não psiquiátricos, selecionados numa comunidade religiosa de Salvador, no qual foram realizados os mesmos procedimentos do grupo de alcoólatras. Os sítios de coleta das células dos indivíduos de ambos os grupos estavam livres de alterações tais como ulcerações ou outras lesões.

### Análise de micronúcleos e de células micronucleadas

Realizou-se a contagem de no mínimo 1.000 células de cada sítio para a análise de células micronucleadas e de micronúcleos por célula. A avaliação das lâminas foi procedida em teste cego, em que o observador não teve conhecimento dos grupos e dos sítios estudados. Os critérios utilizados para identificação de micronúcleo foram os previamente estabelecidos por Coutryman, Heddle<sup>5</sup> (1976): 1) presença de material nuclear; 2) ter intensidade de luz maior ou igual à do núcleo; 3) ter forma circular ou oval; 4) possuir área menor do que 1/5 do núcleo; 5) estar completamente separado do núcleo.

Para o estudo estatístico, utilizou-se o teste de Mann-Whitney, na comparação das variáveis mensuradas entre os grupos de indivíduos expostos e não expostos ao etanol. O grau de correlação entre as variáveis de interesse foi calculado através do teste de Spearman.

## RESULTADOS

Para a análise dos resultados, compararam-se os dois grupos de estudo, constituídos por indivíduos expostos e não expostos ao etanol, avaliando-se a idade, o sexo, as células esfoliadas da língua e da mucosa jugal, as células micronucleadas e os micronúcleos. Nos indivíduos expostos, observou-se consumo semanal mediano de 2.555 ml de etanol e média de 25,5 anos de exposição. A Tabela 1 demonstra que todos os indivíduos analisados pertenciam ao sexo masculino, com médias de ida-

**TABELA 1** - Distribuição do sexo, idade e de células esfoliadas da língua e da mucosa jugal em indivíduos expostos e não expostos ao etanol.

Indivíduos	n	Sexo	Idade (anos)	Células da língua (n)		Células da mucosa jugal (n)	
			Média ± DP	Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
Expostos	40	M	42,0 ± 9,4	2.042,5	2.144,0	1.560,0	1.780,0
Não expostos	20	M	42,3 ± 9,9	3.178,0	3.103,0	1.574,0	1.393,0
Valor de p			0,9875	0,4284		0,5356	

DP: desvio padrão; IIQ: intervalo interquartilício.

**TABELA 2** - Distribuição de células micronucleadas na língua e na mucosa jugal em indivíduos expostos e não expostos ao etanol.

Indivíduos	n	Células micronucleadas (%)			
		Língua		Mucosa jugal	
		Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
Expostos	40	0,22	0,20	0,07	0,20
Não expostos	20	0,05	0,15	0,04	0,18
Valor de p		0,0009*		0,3493	

IIQ: intervalo interquartilico. \*Estatisticamente significativo ao nível de 1% (teste de Mann-Whitney).

de semelhantes. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na distribuição de células examinadas da língua e mucosa jugal nos dois grupos de estudo ( $p > 0,05$ ).

Comparando-se as células micronucleadas da língua dos indivíduos expostos e não expostos ao etanol foi encontrada diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,01$ ). Observa-se também que a mediana da frequência de células micronucleadas na mucosa jugal é maior no grupo que consome etanol do que nos indivíduos abstêmios, apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ; Tabela 2).

Em relação ao micronúcleo, comparando-se os dois grupos de estudo, a mediana da frequência foi significativamente maior somente na língua ( $p < 0,01$ ; Tabela 3).

Unindo-se os dois sítios estudados, observa-se que as medianas das frequências de células micronucleadas e de micronúcleos foram significativamente maiores no grupo de indivíduos expostos, quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,01$ ; Tabela 4).

A correlação de Spearman entre as frequências de células micronucleadas da língua e da mucosa jugal nos indivíduos expostos ( $r = 0,503$ ;  $p = 0,7577$ ) e não expostos ( $r = 0,3721$ ;  $p = 0,1062$ ) não foi estatisticamente significativa. Em relação aos micronúcleos, tal correlação no grupo de indivíduos expostos ao etanol ( $r = 0,0121$ ;  $p = 0,9411$ ) e no de não expostos ( $r = 0,4192$ ;  $p = 0,0658$ ) também não apresentou significância estatística.

## DISCUSSÃO

O câncer bucal é a sexta neoplasia maligna mais comum no mundo, sendo o carcinoma epidermóide a sua forma mais prevalente. Na Europa,

**TABELA 3** - Distribuição de micronúcleos na língua e na mucosa jugal em indivíduos expostos e não expostos ao etanol.

Indivíduos	n	Micronúcleos (%)			
		Língua		Mucosa jugal	
		Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
Expostos	40	0,23	0,19	0,07	0,21
Não expostos	20	0,05	0,16	0,04	0,25
Valor de p		0,0006*		0,3971	

IIQ: intervalo interquartilico. \*Estatisticamente significativo ao nível de 1% (teste de Mann-Whitney).

**TABELA 4** - Distribuição total de células micronucleadas e de micronúcleos, em indivíduos expostos e não expostos ao etanol.

Indivíduos	n	Células micronucleadas (%)		Micronúcleos (%)	
		Mediana	IIQ	Mediana	IIQ
Expostos	40	0,18	0,14	0,18	0,12
Não expostos	20	0,09	0,10	0,11	0,11
Valor de p		0,0004*		0,0008*	

IIQ: intervalo interquartilico. \*Estatisticamente significativo ao nível de 1% (teste de Mann-Whitney).

particularmente a França tem uma alta incidência do câncer orofaríngeo que é aproximadamente duas vezes maior que nos Estados Unidos<sup>2</sup>. Países em desenvolvimento como a Índia, Sri Lanka, Vietnã do Sul e Brasil figuram na literatura com altas taxas de câncer bucal, variando a sua prevalência de região para região<sup>6,10</sup>. O câncer é considerado como resultado de múltiplos erros e mudanças genéticas que se acumulam nas células levando à sua degeneração<sup>4</sup>. A sua origem multifatorial torna o controle mais difícil do que em outras doenças e os fatores de risco mais envolvidos na etiologia do câncer bucal são o fumo e o consumo excessivo de álcool<sup>3</sup>. Ziegler<sup>28</sup> (1986), em estudo epidemiológico, demonstrou que indivíduos alcoólatras apresentavam risco de câncer 6,4 vezes maior que indivíduos abstêmios de álcool. Em geral, a ação carcinogênica do álcool ocorre em níveis de exposição superiores a 45 ml de etanol por dia. Em nossa amostra constituída por indivíduos alcoólatras com ausência de neoplasia maligna oral, constatou-se que o menor consumo de etanol foi de 34,7 ml/dia e o maior de 1.825 ml/dia, com exposição média de

25,5 anos. Schottenfeld<sup>19</sup> (1979) demonstrou uma alta ocorrência de lesões relacionadas ao etanol no assoalho de boca, orofaringe e esôfago. Nessas localizações, esses resultados foram interpretados por Kissin<sup>11</sup> (1975) como uma ação carcinogênica local do etanol, maior do que sua atuação sistêmica.

A obtenção dos dados referentes ao consumo de álcool e de fumo mediante registro em questionário tem sido largamente utilizada em diversos estudos<sup>7,14,17,18</sup>. Algumas dificuldades têm sido relatadas nos estudos referentes ao tipo de bebida e risco de câncer bucal. Os diferentes métodos utilizados de quantificação do etanol, a diversidade de bebidas alcoólicas nos vários países do mundo e informações pouco fidedignas dos indivíduos entrevistados figuram entre os problemas mais frequentes. O nosso estudo foi conduzido dentro de um programa de reabilitação para indivíduos alcoólatras, onde a severidade da doença era conhecida por todos os entrevistados e a procura para tratamento foi sempre voluntária. Esses aspectos devem ter provavelmente ajudado a reduzir uma subestimação de informações em relação ao consumo de álcool pelos entrevistados.

Tem sido relatado na literatura que o álcool além de causar doenças gastrointestinais, distúrbios vasculares e desordens no sistema nervoso central, facilita a penetração de carcinógenos na mucosa bucal<sup>12,14</sup>. Este fenômeno pode ser explicado através da solubilização de alguns agentes genotóxicos ou talvez pelo aumento da permeabilidade da mucosa na presença do álcool. Outro aspecto levantado é a maior permeabilidade de mucosas não queratinizadas como a do bordo lateral da língua e da mucosa jugal comparadas a tecidos queratinizados existentes nas mucosas de revestimento do palato e da gengiva<sup>27</sup>. Em nosso estudo, foram investigados dois sítios de mucosa não queratinizada da cavidade bucal. O bordo lateral de língua, descrito na literatura como o local mais prevalente de câncer bucal<sup>13,20</sup>, mostrou frequência elevada de células micronucleadas e de micronúcleos quando comparados ao grupo controle. A mucosa jugal, um outro sítio analisado, apesar de também ser revestida por epitélio pavimentoso estratificado não queratinizado, mostrou resultados bem menos expressivos. Esses resultados confirmam relatos da literatura que indicam a mucosa jugal como um sítio menos exposto à ação de carcinógenos<sup>8,21</sup>.

Marcadores biológicos podem refletir doses de exposição a carcinógenos e sua interação com macromoléculas, como o DNA. Como as interações do DNA com substâncias químicas são reconhecidas o primeiro passo na iniciação do câncer, maior ênfase deve ser dada aos métodos que detectam a atividade genotóxica em humanos<sup>9,17</sup>. Os biomarcadores podem ser utilizados na prevenção individual de tumores e, principalmente, na detecção de pacientes de alto risco<sup>17</sup>.

Os micronúcleos contêm material genético que foi perdido do genoma durante a mitose, como resultado de eventos clastogênicos ou aneugênicos e ocorrem antes de qualquer mudança histopatológica pré-neoplásica tornar-se evidente<sup>3,25</sup>. Sua quantificação foi utilizada pela primeira vez por Stich *et al.*<sup>22</sup> em 1982, que demonstraram maior frequência na mucosa bucal de indivíduos fumantes. A detecção de micronúcleos demonstra a exposição atual da mucosa a agentes genotóxicos<sup>3</sup>. Em nosso estudo, a coleta de células esfoliadas da mucosa bucal dos pacientes alcoólatras foi executada até 48 horas após sua internação num programa de desintoxicação para dependentes de álcool. Um significativo aumento de micronúcleos e de células micronucleadas encontradas na mucosa oral desses indivíduos refletiu o efeito genotóxico do etanol, ainda que na ausência de fumo. Mesmo considerando-se o alto índice de renovação celular da mucosa oral, Ogden *et al.*<sup>14</sup> (1999) ainda observaram mudanças citomorfológicas em células esfoliadas da boca de indivíduos alcoólatras após 14 dias de abstinência.

Stich, Rosin<sup>23</sup> (1983) não observaram diferença estatisticamente significativa na frequência de micronúcleos de indivíduos que consumiam frequentemente bebidas alcoólicas. Esses resultados não estão de acordo com os nossos achados, onde a presença de micronúcleos revelou-se significativamente elevada na presença isolada do álcool.

Nosso estudo demonstrou que o método para detecção do micronúcleo é um procedimento acessível, não-invasivo, realizado *in vivo*, permitindo a avaliação de mudanças significativas na mucosa bucal de indivíduos expostos ao etanol. Sua maior contribuição está na utilização em programas para detecção de grupos de alto risco e prevenção do câncer bucal, cuja etiologia é influenciada por exposições constantes a agentes genotóxicos.

## REFERÊNCIAS

1. Belliën JAM, Copper MP, Braakhuis BJM, Snow GB, Baak JPA. Standardization of counting micronuclei: definition of a protocol to measure genotoxic damage in human exfoliated cells. *Carcinogenesis* 1995;16(10):2395-400.
2. Berrino F, Gatta G. Variation in survival of patients with head and neck cancer in Europe by the site of origin of the tumours. *Eur J Cancer* 1998;34(14):2154-61.
3. Bloching M, Hofmann A, Lautenschlager C, Berghaus A, Grummt T. Exfoliative cytology of normal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. *Oral Oncology* 2000;36:550-5.
4. Cohen SM, Ellwein LB. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 1990;249:1007-11.
5. Coutryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 1976;41:321-32.
6. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, Fava AS, Torloni H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1989;43:992-1000.
7. Ghose UR, Parida BB. Cytological study of exfoliated buccal mucosa cells of tribes in Orissa State (India) with high risk for oral cancer. *Indian J Cancer* 1995;32(3):95-9.
8. Gimenez-Conti IB, La Bate M, Osterndorff E. p53 alterations in chemically induced hamster cheek-pouch lesions. *Mol Carcinogenesis* 1996;16:197-202.
9. Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation. *Mutat Res* 2001;491:9-16.
10. Hamada GS, Bos AJG, Kasuga H, Hirayama T. Comparative epidemiology of oral cancer in Brazil and India. *Tokai J Exp Clin Med* 1991;16(1):63-72.
11. Kissin B. Epidemiologic investigations of possible biological interactions of alcohol and cancer of the head and neck. *Am NY Acad Sci* 1975;252:374-84.
12. Lieber CS. Herman award lecture, 1993: a personal perspective on alcohol, nutrition, and the liver. *Am J Clin Nutr* 1993; 58:430-42.
13. Marefat MP, Shkalar G. Experimental production of lingual leukoplakia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977;44:578-86.
14. Marmot MG. Alcohol and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1984;13(2):160-7.
15. 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.
16. Popp W, Schell C, Kraus R, Vahrenholz C, Wolf R, Radtke J, Bierwirth K, Norporth K. DNA strand breakage and DNA adducts in lymphocytes of oral cancer patients. *Carcinogenesis* 1993;14(11):2251-6.
17. Prasad MPR, Mukundan MA, Krishnaswamy K. Micronuclei and carcinogen DNA adducts as intermediate end points in nutrient intervention trial of precancerous lesions in the oral cavity. *Oral Oncol* 1995;31B(3):155-9.
18. Roberts DM. Comparative cytology of the oral cavities of snuff users. *Acta Cytol* 1997;41(4):1008-14.
19. Schottenfeld D. Alcohol as a co-factor in the etiology of cancer. *Cancer* 1979;43(5):1962-6.
20. Schwartz JL, Gu X, Kittles RA, Baptiste A, Shklar G. Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. *Oral Oncology* 1999;36:225-35.
21. Solt DB. Localization of gamma-glutamyl-transpeptidase in hamster buccal pouch epithelium treated with 7, 12 dimethylbenz(a)anthracene. *J Natl Cancer Inst* 1981;67:193-200.
22. Stich HF, Curtis JR, Bibhuti BP. Application of the MN test to exfoliated cells of high cancer risk groups. *Tobacco chewers*. *Int J Cancer* 1982;30:553-9.
23. Stich HF, Rosin MP. Quantitating the synergistic effect of smoking and alcohol consumption with the micronucleus test on human buccal mucosa cells. *Int J Cancer* 1983;31:305-8.
24. Stich HF, Rosin MP, Hornby AP, Mathew B, Sankaranarayanan R, Nair MK. Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *Int J Cancer* 1988;42:195-9.
25. Stich HF, Rosin MP, Vallejeran MO. Reduction with vitamin A and beta-carotene administration of proportion of micronucleated buccal mucosal cells in Asian betel nut and tobacco chewers. *Thelancet* 1984;2:1204-6.
26. Stich HF, Parida BB, Brunnemann KD. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reverse" smokers, khaini-tobacco chewers and gudakhu users. *Int J Cancer* 1992;50:172-6.
27. Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer - a review. *Oral Oncology* 1998;34:442-7.
28. Ziegler RG. Alcohol-nutrient interactions in cancer etiology. *Cancer* 1986;58:1942-8.

Recebido para publicação em 10/09/2001  
Enviado para reformulação em 08/04/2002  
Aceito para publicação em 16/05/2002