

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE
ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM PATOLOGIA BUCAL

**SURVIVIN E SUA RELAÇÃO COM ÁLCOOL E VITAMINA E EM
EPITÉLIO LINGUAL DE RATOS**

ADRIANA JOU INCHAUSTI

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

*Dissertação
apresentada como
parte dos requisitos
obrigatórios para
obtenção do título de
Mestre em
Odontologia, área de
concentração
Patologia Bucal.*

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

PORTO ALEGRE

2009

*Aos meus pais,
José Antonio e Graciela,
pelo amor e apoio incondicional.*

*“Caminante:
No hay camino, se hace camino al andar.”*

Provérbio español

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manoel Sant`Ana Filho. Sua presença está em cada página desta dissertação. Agradeço não só a orientação e a persistência em me manter no foco, como também os ensinamentos em patologia. Já sinto saudades da rotina.

Ao Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados por ser um exemplo de professor e pelas importantes contribuições na defesa do projeto e nas discussões de seminários.

Aos Professores Dr. João Jorge Barbachan e Dr. Onofre Quadros, por, juntamente com os Professores Manoel e Pantelis, terem sido os responsáveis, durante a graduação, pela minha busca pela patologia.

Ao Prof. Dr. João Batista Burzlaff por ter acreditado mais em mim do que eu acreditava. Por ter me ensinado na prática clínica, o que significa a acolhida de um paciente.

Ao Prof. Dr. Vinícius Carrard, responsável pelo experimento que originou esta dissertação. Obrigada pelas conversas. Ao Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira pela orientação no trabalho experimental. À Marina Mendez e Aline Pires, pela participação na parte experimental.

À Isabel Lauxen pela participação direta e fundamental nesta dissertação. Sua dedicação sincera, paciência e precisão no laboratório tornaram possível a realização deste trabalho com qualidade. Levarei para sempre teus ensinamentos.

À Profa. Dra. Anna Cecília Chaves pelos ensinamentos em estomatologia e à Profa. Dra. Márcia Gaiger de Oliveira pela contribuição e trabalho em conjunto. Às Professoras Dra. Etiene e Dra. Manoela, por terem vindo para a UFRGS.

Aos professores do programa de pós-graduação, em especial, ao Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rosing pela constante colaboração.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro.

Ao colega Fábio Vieira de Miranda pela amizade sincera. A tua parceria nestes dois anos foi muito importante. Encontramos apoio e estímulo um no outro.

Ao amigo Leandro Nunes. Obrigada pela alegria e pela ajuda. Tua companhia transformou momentos de desânimo em risadas. Sempre com alguma coisa boa para falar.

À colega Fernanda Visioli, amiga desde a graduação. Teus passos servem de exemplo para mim e teu apoio foi simplesmente imprescindível. Obrigada pelas conversas a qualquer hora e pelas discussões de tantos planos e sonhos.

À Rosa Savall por todo o carinho e atenção desde os primeiros dias na patologia.

À Francinne Miranda da Rosa. Tua alegria contagiante tornou tudo mais leve. Obrigada pelo apoio nos dias de muito estresse.

À Laura Hildebrand pelo exemplo de dedicação na clínica e pela companhia muito querida e afetuosa. À Ana Luisa Homem de Carvalho pela ajuda na histologia, pelas histórias e pela parceria, sempre divertida.

À Sabrina Moure e Elisabete Rojas pela grande ajuda no início desta caminhada. À Paula e Milane, recém chegadas, pela paciência e empenho. À Chris Krebs Danilevicz e Luciana Adolfo Ferreira pela dedicação e apoio no laboratório.

À Lisiane Bernardi, pela parceria, dividindo as mesmas preocupações. Aos professores da histologia: Júlio Sanfelice, Esdras Heinrich, Dra. Ana Paula Horn, Dra. Anna Fossati e Dr. Rui Lopes, obrigada pelo apoio e compreensão.

À Adriana Aguiar e Cláudia Freire por todo o auxílio.

Às bibliotecárias da FO-UFRGS por estarem sempre dispostas a ajudar.

À Sílvia Rosa por todas as explicações em biologia molecular e à Carla Berto, pelos sábios conselhos. À Victória Milanez por me ensinar a nunca desistir. A Joana Passos, Cláudia Neiva e Gabriela Hauqui pela amizade.

À amiga Neida Maria Ramos Marques, que me acompanha há muitos anos, sempre cuidando de mim.

À minha família no Uruguai. A distância não nos deixou longe.

Ao Daniel Bertuzzi, meu namorado, amigo e colega, sempre disposto a largar tudo para me ajudar, sempre torcendo por mim. Todas as angústias e frustrações, mas também as conquistas e alegrias desta caminhada fizeram parte da nossa convivência. Teu apoio e confiança foram e são fundamentais.

Aos meus irmãos, Antonio, Diego e Roberto por estarem sempre me ensinando, com suas diferentes personalidades, e pela ajuda constante. As minhas cunhadas, Natália, Fabiana e Paula, e meus sobrinhos, Martin, João Paulo, Jordi e Ricardo, por tantos momentos de alegria.

Ao meu pai, José, pela enorme contribuição com planejamentos, números, planilhas e gráficos ao longo desses anos. Obrigada por me ensinar que estudo, esforço e dedicação sempre valem a pena.

A minha mãe, pela imensa dedicação a mim. Tu és o maior exemplo que tento seguir de mulher, professora, pesquisadora e amiga. Obrigada por ter sempre sonhado comigo os meus sonhos.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	8
OBJETIVO.....	16
REFERÊNCIAS	17
ARTIGO	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4 DISCUSSÃO.....	31
5 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS	34
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da ingestão crônica de álcool, cessação e co-tratamento com vitamina E no ventre lingual de ratos, por meio da avaliação de marcação da proteína anti apoptótica survivin e da espessura epitelial, sendo um estudo experimental randomizado, em paralelo, cego, controlado. Foi analisado o epitélio lingual de 43 ratos, divididos em 3 grupos com álcool (Álcool; Álcool Cessação; Álcool e Vitamina E) e 3 grupos sem álcool (Controle; Tween; Vitamina E). Foi quantificada a percentagem de células marcadas com survivin das camadas basal e suprabasal e a espessura do epitélio lingual, comparando os grupos. Os resultados mostraram que houve marcação de survivin nas camadas citadas em todos os grupos e não houve diferença significativa entre eles, assim como em relação à espessura epitelial. Conclui-se que survivin está marcado em situações fisiológicas na mucosa e não é alterado pelo consumo de álcool, assim como a espessura do tecido, confirmando o papel promotor do álcool.

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O álcool é um fator de risco para o desenvolvimento de vários tipos de câncer, sendo considerado um fator promotor. Nas associações encontradas entre álcool e câncer, o risco mais alto observado é para o desenvolvimento de câncer no trato aero digestivo superior, especialmente se associado ao fumo⁽¹⁾. Com relação ao efeito do álcool isolado, estudos mostraram aumento da proliferação celular em mucosas de animais submetidos à ingestão crônica de álcool⁽²⁻⁵⁾. Acredita-se que mecanismos que levam à hiper regeneração celular são relevantes com respeito à carcinogênese associada ao álcool⁽⁶⁾. Estudos demonstraram que a ingestão crônica de álcool altera o processo de renovação celular havendo um aumento da proliferação celular, reforçando o papel do álcool como promotor^(2-5, 7).

A proliferação celular como resposta à ingestão crônica de etanol foi previamente estudada pelo grupo de pesquisa da Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRGS. Essa proliferação celular foi analisada através de imunohistoquímica e histoquímica^(2, 3).

Utilizando a técnica imunohistoquímica, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), marcador sensível para detectar alterações no ciclo celular, foi utilizado na mucosa bucal de camundongos expostos ao álcool. Os animais foram divididos em três grupos: um grupo exposto a aplicações tópicas de álcool, um grupo submetido à ingestão de álcool e um grupo controle. Foram realizadas biópsias do dorso da língua dos camundongos no início do estudo e após 6 e 12 meses. Os autores demonstraram que a ingestão contínua de álcool por 12 meses aumentou a proliferação celular⁽²⁾.

Através da técnica histoquímica de impregnação pela prata nas regiões organizadoras de nucléolos (AgNOR), a qual indica a velocidade de proliferação celular, foram analisadas as células das camadas basal, suprabasal e intermediária. Os resultados deste estudo mostram que, entre 6 e 12 meses, houve aumento da proliferação celular na camada suprabasal da mucosa dos camundongos que ingeriram álcool. Os autores observaram que não houve modificação na atividade proliferativa com o envelhecimento, já que no grupo controle não ocorreu variação na quantificação de AgNORs, concordando com Maito et al (2003) que também verificaram não haver alteração na expressão de PCNA com o envelhecimento.

Ambos os estudos sugerem que as células da camada intermediária são as responsáveis pelo aumento da proliferação celular, de acordo como os resultados do estudo de Homann et al ^(2, 3, 7). A partir dessa observação sugeriu-se que células continuam proliferando na camada suprabasal devido à ação do álcool ⁽²⁾.

Recentemente, neste grupo de pesquisa, foi avaliada a proliferação celular também pela técnica de AgNOR em ratos submetidos à ingestão crônica de álcool por 4 meses. No estudo foi observada maior quantidade de AgNOR na camada suprabasal do ventre lingual resultante da ingestão de álcool⁽⁸⁾. Esses achados confirmam os de Maito et al (2003) e Carrard et al (2004), e demonstram que essa proliferação celular na camada suprabasal já está aumentada em um período menor que os estudos anteriores observaram^(2, 3).

Por outro lado, na mesma amostra de Maito et al (2003) e Carrard et al (2004), Sanfelice et al (2003) observaram menor espessura do epitélio lingual após 6 meses de ingestão crônica de álcool quando comparado ao controle, concordando com outros estudos morfométricos da mucosa bucal^(2, 3, 9-11). Esse fato pode ser atribuído à diminuição na ceratinização ou ao aumento da descamação do epitélio bucal. Pode-se pensar também que exista uma relação de causalidade entre essas alterações uma vez que o aumento da proliferação celular pode ser uma resposta ao aumento da apoptose e/ou da descamação na função de manter a homeostasia do tecido ^(2, 3). Contudo, foi observado que tanto a exposição tópica ao álcool como a ingestão causam diminuição na espessura, mas somente a ingestão de álcool provoca aumento de proliferação, concluindo-se que o aumento da descamação não provoca uma maior atividade proliferativa celular ^(2, 3, 11).

Portanto, dando continuidade a essa linha de pesquisa decidiu-se estudar o processo apoptótico através da técnica de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase Uridine Nick End Labeling* – Marcação de extremidade fragmentada do genoma pela enzima transferase terminal de deoxinucleotídeos). Então, na mesma amostra de camundongos utilizada por Sanfelice et al (2003), Maito et al (2003) e Carrard et al (2004), Danesi et al (2003) encontraram aumento da apoptose em resposta à ingestão crônica de álcool 40% na camada superficial do epitélio. Portanto, o aumento da apoptose parece não ocorrer nas camadas basal e suprabasal⁽¹²⁾.

Sabe-se que, em hepatócitos, o álcool induz a apoptose através de um processo complexo que é iniciado pela ativação de caspases ^(13, 14). A cascata de

caspases é formada por algumas caspases suscetíveis a modificações por proteínas endógenas e outras diretamente ligadas à apoptose, como a caspase-3.

Slomiany et al (1998) realizaram dois estudos em ratos analisando o processo de apoptose das células epiteliais na mucosa jugal induzida pelo álcool ^(15, 16). No primeiro estudo os autores estudaram a expressão de TNF- α (tumor necrosis factor- α) e IL-4 (interleukin-4) e a extensão de apoptose nas células epiteliais com consumo crônico de etanol por 23 dias verificando que houve 3,5 vezes mais apoptose no grupo com álcool que no grupo controle. Nos animais com dieta crônica de álcool houve correlação positiva entre a extensão de apoptose das células epiteliais da mucosa jugal e a expressão de TNF- α , enquanto o aumento de IL-4 nesses animais não foi estatisticamente significativo, sendo concluído que o processo apoptótico induzido por consumo crônico de etanol envolve a ativação de TNF- α . No segundo estudo investigou-se a expressão de NOS-2 (nitric oxide synthase-2) e a atividade da caspase-3 associadas a apoptose de células da mucosa jugal induzida por consumo crônico de álcool durante 9 semanas. Os resultados apontam para a participação de NOS-2 na amplificação da sinalização da cascata apoptótica e demonstram 37,6 vezes mais atividade da caspase-3 no grupo álcool que no grupo controle. A caspase-3 está envolvida na proteólise de proteínas estruturais do fuso mitótico durante a apoptose ⁽¹⁷⁾. Proteínas capazes de inibir a atividade de caspases são as IAPs (proteínas inibidoras de apoptose) e foi identificado que a proteína anti apoptótica survivin é capaz de inibir caspase-3⁽¹⁸⁾.

Survivin é uma proteína da família IAP com três funções biológicas: inibição da apoptose, regulação da divisão celular e a angiogênese. Essa proteína é fundamental para o desenvolvimento embrionário e é importante em tecidos lábeis favorecendo a renovação celular ^(19, 20). Diversos estudos demonstraram a expressão aumentada dessa proteína no câncer, inclusive no câncer bucal ⁽²¹⁻²⁵⁾. Devido a esta condição, survivin é um possível marcador de tumor ⁽²⁶⁾.

A estrutura do survivin diferencia-se das demais proteínas da família IAP por ser a menor com 142 amino ácidos residuais e uma massa molecular de 16.5 kDa, possuindo um único domínio BIR (baculoviral IAP repeat), domínio composto de aproximadamente 70 aminoácidos essenciais para a atividade anti-apoptótica. As proteínas que contém BIR (BIRPs) foram inicialmente observadas em estudos de baculovirose devido à habilidade de inibir a apoptose, entretanto nem todas as

BIRPs são anti-apoptóticas ⁽²⁷⁾. Survivin é a única proteína com um único domínio BIR que apresenta atividade anti-apoptótica ⁽²⁸⁾.

O mecanismo pelo qual survivin inibe a apoptose não é bem entendido. Sabe-se que por meio da associação com microtúbulos do fuso mitótico no início da mitose survivin inibe a apoptose no checkpoint G2/M. Alguns autores não conseguiram confirmar os achados que sugerem que essa proteína inibe a caspase-3 e caspase-7 ⁽²⁹⁾ e outros autores sugeriram que survivin é incapaz de ligar-se com caspases uma vez que o domínio “hook and sinker” o qual permite a ligação das outras IAPs com caspases está ausente em survivin ^(21, 30).

Entretanto, foram propostas outras formas pelas quais survivin poderia inibir a apoptose. Um mecanismo sugerido é a ligação de survivin com o *Second Mitochondria-derived Activator of Caspases* (SMAC), causando a inativação desta proteína mitocondrial, a qual promove apoptose ao inibir a ação de IAPs específicas. Com a ação de SMAC bloqueada, as IAPs podem interagir com caspases inibindo, então, a apoptose ^(31, 32). Outra possibilidade sugerida é a inibição da procaspase-9 por meio da associação de survivin com o *cofactor hepatitis B interacting protein* (HBXIP) ⁽³³⁾ e a inibição da caspase-9 através de complexo formado por survivin e *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein* (XIAP) ⁽³⁴⁾.

Outra função estudada do survivin é a regulação da divisão celular pelo envolvimento dessa proteína na mitose ⁽¹⁸⁾. De fato alguns autores sugeriram que a função primária de survivin é o controle da divisão celular e não a inibição da apoptose ⁽³⁵⁾. Dados sugerem que nas últimas fases da mitose, survivin contribuiria na segregação das cromátides irmãs e na estabilização dos microtúbulos, por meio da associação com as proteínas aurora B, INCENP e borealin ⁽³⁵⁾. Contudo, não é bem compreendido se a supressão da apoptose e a promoção da mitose são duas funções separadas. Com relação a isso, Colnaghi et al (2006) demonstraram que a região ligante entre o domínio BIR de survivin e COOH-terminal α hélix pode ser o fator chave na separação das funções anti-apoptótica e mitótica. Esses autores observaram que survivin apresenta um NES (nuclear exportation signal) no domínio central e reportaram que mutação nesse NES pode eliminar a atividade citoprotetora de survivin mantendo a função mitótica ⁽³⁶⁾. Quanto à função de angiogênese explicitada em vários estudos esta parece estar ligada à função de inibir apoptose nas células endoteliais, aumentando suas chances de sobrevivência ^(26, 37-41).

A distribuição subcelular do survivin foi detectada utilizando imunohistoquímica, sendo localizada em dois compartimentos principais, no núcleo e no citoplasma sendo esta última a localização subcelular predominante ^(42, 43). Recentemente, survivin foi identificada na mitocôndria de células tumorais ⁽⁴⁴⁾. Frente ao estímulo apoptótico, essas proteínas são liberadas no citoplasma, atuando como inibidoras da apoptose ⁽²⁶⁾. A distribuição subcelular parece ser alterada ao longo do ciclo celular ⁽⁴⁵⁾.

Observou-se que quando há superexpressão de survivin ocorre a presença dessa proteína nas células na interfase e a proteína transita entre o citoplasma e o núcleo, sendo, portanto detectada em pacientes com câncer tanto como uma proteína citoplasmática como nuclear. A concentração citoplasmática/mitocondrial de survivin parece facilitar a interação desta proteína com a maquinaria apoptótica das células cancerosas tendo um efeito citoprotetor enquanto que é possível que a concentração nuclear de survivin controle a divisão celular ⁽⁴⁵⁾.

Há pouca evidência com relação ao significado da localização de survivin no citoplasma ou no núcleo, contudo os resultados dos estudos sugerem que a localização nuclear está associada somente a células malignas. Jane et al (2006) observaram que a expressão de survivin nuclear foi encontrada em apenas 2 dos 38 casos de carcinomas bucais, sendo esses 2 pobremente diferenciados com expressão moderada a forte de survivin ⁽⁴⁶⁾. Esses resultados estão de acordo com outros estudos. Moon et al (2003) observaram expressão citoplasmática de survivin em hepatócitos não malignos e expressão nuclear e citoplasmática em células de carcinoma hepatocelular ⁽²⁵⁾ e Ding et al (2006) também encontraram somente expressão citoplasmática de survivin em células névicas enquanto que em células de melanoma foi observada expressão tanto citoplasmática como nuclear ⁽⁴⁷⁾. Li et al (2005) realizaram revisão de literatura identificando 19 publicações que mensuraram survivin nuclear em tumores humanos. A expressão nuclear foi relacionada com prognóstico desfavorável em 9 estudos enquanto 5 trabalhos relacionaram essa expressão com prognóstico favorável. As outras 5 publicações não relacionaram expressão nuclear com prognóstico.

Apesar de estar ausente na maioria dos tecidos adultos diferenciados, survivin é encontrada em situações fisiológicas em alguns tipos de células proliferativas e nestas situações está expressa somente durante a mitose ^(18, 48). Nos cânceres humanos essa proteína é expressa nas células neoplásicas permitindo a proliferação

de células alteradas ^(18, 22). Esse fato sugere que a própria transformação maligna possa estar associada a alteração na expressão do gene survivin que parece ser modulada por um mecanismo epigenético ⁽⁴⁹⁾.

Assim como em outros tipos de cânceres, a expressão de survivin é um evento precoce durante a transformação maligna da mucosa bucal ^(18, 26, 50-53). Em lesões bucais cancerizáveis, survivin pode ser útil na identificação de lesões com risco de progressão para carcinoma ^(50, 52).

Estudos imunoistoquímicos avaliaram a expressão de survivin em lesões cancerizáveis e carcinomas espinocelulares da boca ^(46, 52). Lo Muzio et al (2003) estudaram a expressão de survivin em 30 lesões cancerizáveis que não evoluíram para carcinoma, encontrando que 33% dessas lesões apresentaram expressão de survivin, e observaram 16 lesões que evoluíram para carcinoma, das quais 15 apresentaram expressão dessa proteína. Jane et al (2006) encontraram expressão de survivin em 11 das 17 leucoplasias e em 33 dos 39 carcinomas. Esses estudos usaram os seguintes critérios para a expressão de survivin: 0 (<5%) negativa, +1 (5-25%) fraca, +2 (25%- 50%) moderada, +3 (>50%) forte. A expressão forte de survivin foi observada somente nos casos de carcinoma pobremente diferenciados ⁽⁴⁶⁾.

Revisando a literatura de forma sistemática na base de dados PUBMED, no período de 01/01/1966 até 31/05/2009, cruzando as palavras chave *oral cancer, oral carcinogenesis, oral epithelium, oral cells, oropharyngeal cancer, head and neck cancer, oral mucosa e oral squamous cell carcinoma* com survivin, nos idiomas espanhol, inglês, italiano e alemão foram encontrados 143 artigos. Dos 28 artigos relacionados à câncer bucal em humanos, 24 utilizaram imunoistoquímica. Desses estudos a minoria utiliza o anticorpo survivin monoclonal ^(23, 24, 48, 52).

São conhecidas cinco variantes estruturais a partir do gene survivin, são elas: survivin, survivin-2B, survivin- Δ Ex3, survivin 3B e survivin 2a. É importante considerar qual clone está sendo usado uma vez que as diferentes isoformas podem ter efeitos diversos sobre a apoptose, por exemplo, observou-se que a variante survivin- Δ Ex3 mantém a função anti-apoptótica enquanto a variante survivin 2B apresenta capacidade reduzida de inibição da apoptose ⁽⁵⁴⁾. A variante mais conhecida é a survivin e é a que foi estudada neste trabalho.

Devido às características de survivin muitos estudos têm apontado a utilidade dessa proteína não só no diagnóstico como também no tratamento do câncer. Em

estudos com células cancerosas observou-se que a vitamina E diminuiu os níveis da proteína survivin ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾.

Já, com relação à vitamina E e ao álcool, sabe-se que o dano provocado pelo álcool envolve estresse oxidativo em diversos tecidos. O fator carcinogênico e envolvido na liberação de espécies reativas de oxigênio é o acetaldeído, o qual é o primeiro metabólito gerado durante a oxidação do álcool⁽⁶⁾. Com base nisso foi proposto na literatura um possível efeito protetor de antioxidantes, como a vitamina E (α -tocopherol) ⁽⁵⁸⁾.

A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel com ação antioxidante sendo a forma mais ativa o α -tocoferol. Em ratos submetidos à ingestão crônica de álcool Vincon et al (2004) observaram que α -tocoferol reduziu a taxa de proliferação na mucosa do cólon ⁽⁵⁸⁾. Já, no estudo de Hossein et al (1995), em fígado de ratos, esse efeito protetor com relação ao dano provocado pelo álcool não foi observado⁽⁵⁹⁾.

Seguindo a linha de pesquisa da Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFRGS, nos mesmos animais usados na pesquisa conduzida como parte desta dissertação de mestrado, foi avaliado, por parâmetros oxidativos, o efeito protetor da vitamina E na ingestão aguda e crônica de álcool. Não foi encontrado o efeito protetor da vitamina E, entretanto essa ausência de efeito protetor pode ser atribuída à concentração da solução de Tween 80 (5%) utilizada como veículo para a vitamina E. O veículo parece ter apresentado efeito pró-oxidante uma vez que o grupo Vitamina E apresentou maiores níveis de TBARS (Thiobarbituric acid-reactive substances) que o controle.

É interesse também deste grupo de pesquisa avaliar a reversibilidade das alterações causadas pelo álcool. Não foi encontrado nenhum artigo na literatura que avalie o efeito da cessação do álcool na mucosa bucal. Entretanto, dados não publicados de Carrard et al (2009) demonstram diminuição nos níveis de TBARS e da proliferação celular no epitélio lingual em resposta à cessação do consumo de álcool, sugerindo reversibilidade das alterações causadas pelo álcool.

Sabendo que survivin está envolvida tanto na regulação da divisão celular quanto na apoptose e considerando que o etanol altera esses dois processos, o estudo da imunomarcagem dessa proteína pode ser útil para um maior entendimento das alterações induzidas pelo etanol na mucosa bucal e pode contribuir para a utilização dessa proteína como um fator predictivo de malignização.

O papel de survivin na malignização, inclusive da mucosa bucal, vem sendo amplamente estudado^(23-25, 42, 48, 50, 52, 53). Entretanto, a participação de survivin na manutenção da integridade celular daqueles tecidos diferenciados que tem normalmente expressão de survivin, não foi suficientemente explorado. Na mucosa gástrica submetida a pré tratamento com álcool em média concentração (20%) antes do tratamento com álcool em alta concentração (50%), foi observado o efeito citoprotetor de survivin dependente da concentração de álcool⁽⁶⁰⁾. Na mucosa bucal esse mecanismo citoprotetor é pouco compreendido. Considerando o aumento de proliferação observado na camada suprabasal, o aumento da apoptose na camada descamativa e a observação de diminuição de espessura resultante da ingestão crônica de álcool, questionou-se se há mecanismos anti apoptóticos envolvidos nas alterações provocadas pelo álcool.

OBJETIVO

Avaliar a imunomarcção de survivin e realizar análise morfométrica no epitélio lingual de ratos submetidos à ingestão crônica de álcool, cessação do uso e associação com vitamina E.

REFERÊNCIAS

1. Seitz HK, Becker P. Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Res Health* 2007;**30**:38-41, 44-37.
2. 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**:25-30.
3. 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**:233-238.
4. Simanowski UA, Stickel F, Maier H, Gartner U, Seitz HK. Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis. *Alcohol* 1995;**12**:111-115.
5. Simanowski UA, Suter P, Russell RM, Heller M, Waldherr R, Ward R, et al. Enhancement of ethanol induced rectal mucosal hyper regeneration with age in F344 rats. *Gut* 1994;**35**:1102-1106.
6. Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA. Alcohol and cancer. *Recent Dev Alcohol* 1998;**14**:67-95.
7. 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**:1692-1697.
8. Carrard V. Avaliação dos efeitos de 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 [Doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2008.
9. Sanfelice JCP, D.M.P.; Sant'Ana Filho, M. . Alterações morfológicas em epitélio lingual de camundongos expostos ao álcool etílico a 40o GL. . *R Fac Odontol* 2003;**44**:3-14.
10. 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**:654-665.
11. 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**:387-391.
12. Danesi C. Quantificação da apoptose em epitélio lingual de camundongos submetidos à ingestão e ação tópica de álcool etílico a 40°GL []. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2003.
13. Zhang Y, Venugopal SK, He S, Liu P, Wu J, Zern MA. Ethanol induces apoptosis in hepatocytes by a pathway involving novel protein kinase C isoforms. *Cell Signal* 2007;**19**:2339-2350.
14. Katz GG, Shear NH, Malkiewicz IM, Valentino K, Neuman MG. Signaling for ethanol-induced apoptosis and repair in vitro. *Clin Biochem* 2001;**34**:219-227.
15. Slomiany BL, Piotrowski J, Piotrowski E, Slomiany A. Activation of apoptotic caspase-3 and nitric oxide synthase-2 in buccal mucosa with chronic alcohol ingestion. *Biochem Mol Biol Int* 1998;**45**:1199-1209.
16. Slomiany BL, Piotrowski J, Piotrowski E, Slomiany A. Induction of buccal mucosal apoptosis with chronic alcohol ingestion. *Biochem Mol Biol Int* 1998;**44**:381-389.

17. Andrade F, Roy S, Nicholson D, Thornberry N, Rosen A, Casciola-Rosen L, Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* 1998;**8**:451-460.
18. Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 1998;**396**:580-584.
19. Fukuda S, Pelus LM. Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood* 2001;**98**:2091-2100.
20. Chiou SK, Moon WS, Jones MK, Tarnawski AS. Survivin expression in the stomach: implications for mucosal integrity and protection. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;**305**:374-379.
21. Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 2003;**22**:8581-8589.
22. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997;**3**:917-921.
23. Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Pezzetti F, Stabellini G, Laino G, et al. Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett* 2005;**225**:27-33.
24. Marioni G, Bedogni A, Giacomelli L, Ferraro SM, Bertolin A, Facco E, et al. Survivin expression is significantly higher in pN+ oral and oropharyngeal primary squamous cell carcinomas than in pN0 carcinomas. *Acta Otolaryngol* 2005;**125**:1218-1223.
25. Moon WS, Tarnawski AS. Nuclear translocation of survivin in hepatocellular carcinoma: a key to cancer cell growth? *Hum Pathol* 2003;**34**:1119-1126.
26. Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor biomarker. *Cancer Lett* 2007;**249**:49-60.
27. Crook NE, Clem RJ, Miller LK. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 1993;**67**:2168-2174.
28. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, et al. An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 2001;**40**:1117-1123.
29. Banks DP, Plescia J, Altieri DC, Chen J, Rosenberg SH, Zhang H, et al. Survivin does not inhibit caspase-3 activity. *Blood* 2000;**96**:4002-4003.
30. Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 2001;**104**:781-790.
31. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;**102**:33-42.
32. Song Z, Yao X, Wu M. Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003;**278**:23130-23140.
33. Marusawa H, Matsuzawa S, Welsh K, Zou H, Armstrong R, Tamm I, et al. HBXIP functions as a cofactor of survivin in apoptosis suppression. *Embo J* 2003;**22**:2729-2740.
34. Dohi T, Okada K, Xia F, Wilford CE, Samuel T, Welsh K, et al. An IAP-IAP complex inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 2004;**279**:34087-34090.
35. Yang D, Welm A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;**101**:15100-15105.

36. Colnaghi R, Connell CM, Barrett RM, Wheatley SP. Separating the anti-apoptotic and mitotic roles of survivin. *J Biol Chem* 2006;**281**:33450-33456.
37. Conway EM, Zwerts F, Van Eygen V, DeVriese A, Nagai N, Luo W, et al. Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain: molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation. *Am J Pathol* 2003;**163**:935-946.
38. Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, Okuda J, Watanabe I, Yamamoto T, et al. Expression of survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis. *Cancer* 2001;**91**:2026-2032.
39. O'Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol* 2000;**156**:393-398.
40. Tu SP, Jiang XH, Lin MC, Cui JT, Yang Y, Lum CT, et al. Suppression of survivin expression inhibits in vivo tumorigenicity and angiogenesis in gastric cancer. *Cancer Res* 2003;**63**:7724-7732.
41. Tran J, Rak J, Sheehan C, Saibil SD, LaCasse E, Korneluk RG, et al. Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;**264**:781-788.
42. Pannone G, Bufo P, Serpico R, Rubini C, Zamparese R, Corsi F, et al. Survivin phosphorylation and M-phase promoting factor in oral carcinogenesis. *Histol Histopathol* 2007;**22**:1241-1249.
43. Fortugno P, Wall NR, Giodini A, O'Connor DS, Plescia J, Padgett KM, et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. *J Cell Sci* 2002;**115**:575-585.
44. Dohi T, Beltrami E, Wall NR, Plescia J, Altieri DC. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J Clin Invest* 2004;**114**:1117-1127.
45. Stauber RH, Mann W, Knauer SK. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Res* 2007;**67**:5999-6002.
46. Jane C, Nerurkar AV, Shirsat NV, Deshpande RB, Amrapurkar AD, Karjodkar FR. Increased survivin expression in high-grade oral squamous cell carcinoma: a study in Indian tobacco chewers. *J Oral Pathol Med* 2006;**35**:595-601.
47. Ding Y, Prieto VG, Zhang PS, Rosenthal S, Smith KJ, Skelton HG, et al. Nuclear expression of the antiapoptotic protein survivin in malignant melanoma. *Cancer* 2006;**106**:1123-1129.
48. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, et al. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2001;**70**:249-254.
49. Chen YK, Hsue SS, Lin LM. Survivin expression is regulated by an epigenetic mechanism for DMBA-induced hamster buccal-pouch squamous-cell carcinomas. *Arch Oral Biol* 2005;**50**:593-598.
50. Lin CY, Hung HC, Kuo RC, Chiang CP, Kuo MY. Survivin expression predicts poorer prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol* 2005;**41**:645-654.
51. Ribeiro DA, Kitakawa D, Domingues MA, Cabral LA, Marques ME, Salvadori DM. Survivin and inducible nitric oxide synthase production during 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis: a possible relationship. *Exp Mol Pathol* 2007;**83**:131-137.
52. Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, Staibano S, Mignogna MD, De Rosa G, et al. Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *J Dent Res* 2003;**82**:923-928.
53. Tanaka C, Uzawa K, Shibahara T, Yokoe H, Noma H, Tanzawa H. Expression of an inhibitor of apoptosis, survivin, in oral carcinogenesis. *J Dent Res* 2003;**82**:607-611.

54. Verdecia MA, Huang H, Dutil E, Kaiser DA, Hunter T, Noel JP. Structure of the human anti-apoptotic protein survivin reveals a dimeric arrangement. *Nat Struct Biol* 2000;**7**:602-608.
55. Gunawardena K, Campbell LD, Meikle AW. Combination therapy with vitamins C plus E inhibits survivin and human prostate cancer cell growth. *Prostate* 2004;**59**:319-327.
56. Yu W, Shun MC, Anderson K, Chen H, Sanders BG, Kline K. alpha-TEA inhibits survival and enhances death pathways in cisplatin sensitive and resistant human ovarian cancer cells. *Apoptosis* 2006;**11**:1813-1823.
57. Ahn KS, Sethi G, Krishnan K, Aggarwal BB. Gamma-tocotrienol inhibits nuclear factor-kappaB signaling pathway through inhibition of receptor-interacting protein and TAK1 leading to suppression of antiapoptotic gene products and potentiation of apoptosis. *J Biol Chem* 2007;**282**:809-820.
58. Vincon P. Inhibition of Alcohol-Associated Colonic Hyperregeneration by α -Tocopherol in the Rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2003;**27**:100-106.
59. Sadrzadeh SM, Meydani M, Khettry U, Nanji AA. High-dose vitamin E supplementation has no effect on ethanol-induced pathological liver injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;**273**:455-460.
60. Jones MK, Padilla OR, Webb NA, Norng M. The anti-apoptosis protein, survivin, mediates gastric epithelial cell cytoprotection against ethanol-induced injury via activation of the p34(cdc2) cyclin-dependent kinase. *J Cell Physiol* 2008;**215**:750-764.

**SURVIVIN E SUA RELAÇÃO COM ÁLCOOL E VITAMINA E
EM EPITÉLIO LINGUAL DE RATOS**

1 Introdução

O álcool é um fator de risco para o desenvolvimento de vários tipos de câncer, sendo considerado um fator co-carcinogênico. Nas associações encontradas entre álcool e câncer, o risco mais alto observado é para o desenvolvimento de câncer no trato aerodigestivo superior, especialmente se associado ao fumo (Seitz and Becker, 2007). Com relação ao efeito do álcool isolado estudos mostraram aumento da proliferação celular em mucosas de animais submetidos à ingestão crônica de álcool (Carrard et al., 2004; Maito et al., 2003; Simanowski et al., 1995; Simanowski et al., 1994). Acredita-se que mecanismos que levam à hiperregeneração celular são relevantes com respeito à carcinogênese associada ao álcool (Seitz et al., 1998). Um fator carcinogênico é o primeiro metabólito gerado durante a oxidação do álcool, o acetaldeído (Seitz et al., 1998). Sabendo-se que o dano provocado pelo álcool envolve estresse oxidativo, foi proposto na literatura um possível efeito protetor da vitamina E (α -tocopherol), promovendo atenuação do aumento da proliferação celular provocada pelo álcool (Vinson, 2003).

Paradoxalmente ao aumento da proliferação celular, estudos observaram diminuição na espessura epitelial resultante da ingestão crônica de álcool (Maier et al., 1994; Sanfelice, 2003). Esse fato pode ser explicado pelo aumento da apoptose provocada pelo álcool (Slomiany et al., 1998a; Slomiany et al., 1998b; Zhang et al., 2007). Entretanto, foi observado que o álcool pode interferir também de forma anti apoptótica. Recentemente, foi mostrado o efeito citoprotetor da proteína anti apoptótica survivin com relação ao álcool em média concentração (Jones et al., 2008). Essa proteína é importante para o desenvolvimento embrionário e em tecidos lábeis favorecendo a renovação celular (Chiou et al., 2003; Fukuda and Pelus, 2001). Diversos estudos demonstraram a expressão aumentada dessa proteína no câncer, inclusive no câncer bucal (Altieri, 2003; Ambrosini et al., 1997; Lo Muzio et al., 2005; Marioni et al., 2005; Moon and Tarnawski, 2003).

Os mecanismos envolvidos no dano provocado pelo etanol na mucosa bucal não são bem compreendidos, bem como a reversibilidade do dano após a cessação da ingestão crônica de álcool e o possível efeito protetor de antioxidantes. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da ingestão crônica de álcool, cessação e co-tratamento com vitamina E no ventre lingual de ratos, por meio da avaliação de marcação imunistoquímica de survivin e da análise da espessura epitelial.

2 Materiais e métodos

Este é um estudo experimental randomizado, em paralelo, cego, controlado.

Químicos

Álcool: CROMOLINE-QUÍMICA FINA (Diadema, SP, Brasil); α -tocopherol: SIGMA CHEMICAL CO. (St. Louis, MO, USA); Tween 80: RIEDEL-DE-HAËN (Seelze, Niedersachsen, Alemanha).

Animais e tratamento

48 ratos (*Rattus Norvegicus*), provenientes do biotério da FEPPS (Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, Porto Alegre – RS – Brasil), fêmeas, com três meses de idade e peso inicial entre 180-220g foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) com ciclo reverso claro/escuro 12:12h. O tamanho da amostra baseou-se em outros estudos com avaliação de dano pelo consumo de álcool (Campos et al., 2005; Freedman and Shklar, 1978; Gumus et al., 2005; Kalender et al., 2004; Maier et al., 1994).

Os animais foram designados a um dos seis grupos seguintes, pelo método randomizado de estratificação por peso. Houve a perda de quatro ratos durante o experimento e o espécimen removido de um dos ratos foi descartado devido à impossibilidade de avaliação histológica do material. O total resultante foi de 43 ratos (Quadro 1).

Quadro 1

Grupo	n original	n do estudo
Controle – Salina	6	4
Tween	6	6
Vitamina E+Tween	6	6
Álcool uso Contínuo	10	9
Álcool Cessação de Consumo	10	10
Álcool uso Contínuo + Vitamina E+Tween	10	8
Total	48	43

Os grupos Controle, Tween e Vitamina E receberam ração padrão (Nuvilab/CR1, Nuvital Nutrientes LTDA., Colombo, Brasil) e água *ad libitum*. Os grupos álcool,  lcool

Cessação e Álcool Vitamina E receberam a mesma dieta e tiveram a água substituída por álcool etílico 40% (vol./vol) (Cromoline-Química Fina, Diadema, SP, Brasil) *ad libitum*. A concentração de álcool etílico 40% foi escolhida por ser a concentração presente na cachaça, a bebida alcoólica mais consumida pela população brasileira (Neves, 1989). Durante a primeira semana a concentração de álcool etílico foi aumentada gradativamente de 5% a 40% de acordo com a Tabela 1 (adaptado de McMillen et al, 2005) (McMillen et al., 2005). Ao final de dois meses, o grupo Álcool Cessação teve o álcool etílico substituído por água, diminuindo gradativamente a concentração de 40% a 0%. Os grupos Álcool e Álcool Vitamina E seguiram bebendo álcool etílico 40% até o fim do experimento.

Tabela 1. Aumento da concentração de álcool etílico por dia na fase de adaptação ao consumo

Dia	1	2	3	4	5	6	7
Concentração	5%	10%	20%	25%	30%	35%	40%

A vitamina E (α -tocopherol - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; dissolvido em solução de 5% Tween 80 - Riedel-de-Haën, Seelze, Niedersachsen, Alemanha) foi administrada oralmente via gavagem (200mg/kg, 2 vezes por semana) (Kalender et al., 2004) para os grupos álcool/vitamina E e vitamina E. Os grupos álcool, álcool cessação e controle receberam gavagem salina. O grupo Tween recebeu solução de Tween 80 a 5% (Krishnamurthy and Bieri, 1963).

Os volumes (ml) das soluções e a quantidade de ração padrão (g) consumidos foram monitorados ao longo do estudo. O peso (g) dos animais foi observado no início e no final do experimento, assim como o ganho de peso (%) durante o estudo.

No dia 14, foi realizada biópsia com *punch* no dorso da língua dos animais, para observação do efeito agudo do álcool etílico 40% (dados previamente publicados) (Carrard et al., 2009).

Aos 4 meses de experimento, os animais foram mortos por inalação de CO₂. As línguas, forma removidas e divididas ao meio no seu longo eixo, fixadas em formalina neutra tamponada 10% por 24h e submetidas a processamento histológico para inclusão em parafina.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul,

protocolo número 190/05. Os animais foram tratados de acordo com Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Research).

Imunoistoquímica

A partir dos blocos de parafina foi obtido um corte de 4 μm (micrótomo LEICA – modelo RM2155). Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e reidratados em álcool. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, dois banhos de 15min. A recuperação antigênica foi realizada com uma solução previamente aquecida a 90°C de pH 6.0 (low-pH retrieval solution, S1699, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), em uma panela a vapor (Acqua Timer, ARNO, São Paulo, SP, Brasil) a 96°C por 25 minutos. Após esfriarem até temperatura ambiente, os cortes foram incubados em geladeira, por 16 horas, com o anticorpo survivin (anti-rato, clone DO-8, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), diluição 1:50. O sistema de detecção empregado foi o Envision+® (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) e o cromógeno a diaminobenzidina líquida (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Para contra coloração foi utilizada Hematoxilina de Harris (Merck KGaA, Darmstadt, Hessen, Germany). Foram utilizadas lâminas de carcinoma espinocelular bucal como controle positivo (figura 1) e o controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário.

Foram capturadas imagens consecutivas de toda a extensão do epitélio do ventre lingual no aumento de 400x, através de uma câmara de vídeo modelo Q-Color5™ (Olympus America, Inc., Center Valley, PA, USA) acoplada a um microscópio binocular modelo CX41RF (Olympus Latin America, Inc., Miami, FL, USA) e a um computador modelo Dimension 5150 (Dell Inc., Eldorado do Sul, RS, Brasil), utilizando o software Image Pro-Plus 5.1 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japão). De cada lâmina foram sorteadas cinco imagens para análise.

O critério de positividade na marcação imunoistoquímica foi coloração marrom, independente da intensidade. Foram contadas todas as células da camada basal e suprabasal e realizada a porcentagem de células com marcação positiva para survivin. Considerou-se camada basal aquela na qual as células tinham pelo menos uma porção da sua membrana celular em contato com a membrana basal. Camada suprabasal compreendeu as células acima da camada basal, exceto aquelas que apresentavam o achatamento típico das células superficiais. Utilizou-se este critério devido à proliferação celular ser característica da camada basal, sendo as camadas suprajacentes,

responsáveis pelo processo de maturação ou diferenciação celular. Quando houve dúvida quanto à camada de origem de uma célula, optou-se pela sua exclusão do estudo. Também foram excluídas células com núcleos sobrepostos ou dobrados e áreas com presença de artefatos.

Morfometria

Foi realizada análise morfométrica nas mesmas imagens de campos microscópicos em que foi feita a contagem das células positivas para survivin. Para a obtenção das medidas foi utilizada a ferramenta *measure* do software Image Pro-Plus 5.1 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japão).

Em cada imagem foram feitas três medidas nos locais de maior espessura, tanto da camada de ceratina, quanto do epitélio. A espessura epitelial foi medida da camada basal até a camada granulosa. As três medidas de cada camada foram convertidas em média por campo para posterior realização da média por lâmina.

Calibragem e cegamento

A calibragem intra-examinador foi realizada durante o estudo, constituindo na revisão de 11% dos campos. Foi empregado o teste t de student pareado com coeficiente de correlação de Pearson, sendo aceito o valor de 0.7, sem diferença entre as médias.

A análise das lâminas foi feita por um examinador que não estava ciente do grupo ao qual pertenciam as lâminas.

Análise estatística

Foi realizada Análise de Variância (ANOVA) para comparação entre os grupos com relação à marcação de survivin nas camadas basal e suprabasal e à morfometria. Foi aceito o nível de significância $p < 0,05$.

3 Resultados

O peso dos animais no final do experimento e a porcentagem de ganho de peso, usada para controle do efeito da dieta, não foi estatisticamente diferente entre os grupos experimentais (dados não mostrados, $P=0.33$ e $P=0.72$, respectivamente, ANOVA).

Imunoistoquímica

Houve positividade para a marcação de survivin nas camadas basal e suprabasal em todos os grupos (Figura 2). Contudo, não houve diferença significativa com relação à marcação de survivin nas camadas basal e suprabasal entre os grupos deste estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Percentagem de células positivas para survivin nas camadas basal e suprabasal, nos grupos experimentais e controle

Grupo	%survivin+ camada basal		%survivin+ camada suprabasal	
	Média	DP	Média	DP
Álcool Cessação de Consumo	41,93	17,27	53,07	12,02
Álcool uso Contínuo	49,79	19,77	63,72	16,06
Álcool uso Contínuo + Vitamina E+Tween	33,97	19,86	45,88	19,76
Vitamina E+Tween	55,64	18,44	65,05	14,45
Tween	53,48	19,13	65,33	15,99
Controle – Salina	44,86	11,31	52,55	14,46
P	0,835		0,644	

Anova

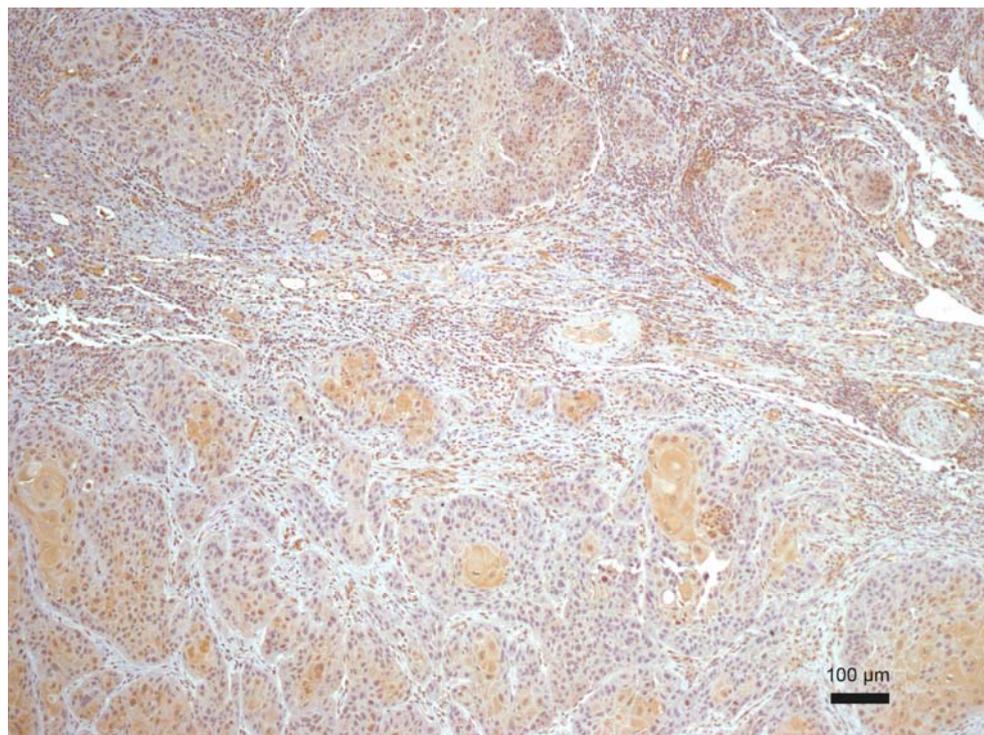


Fig.1. Imagem de marcação imunoistoquímica de survivin em carcinoma espinocelular bucal (100x).

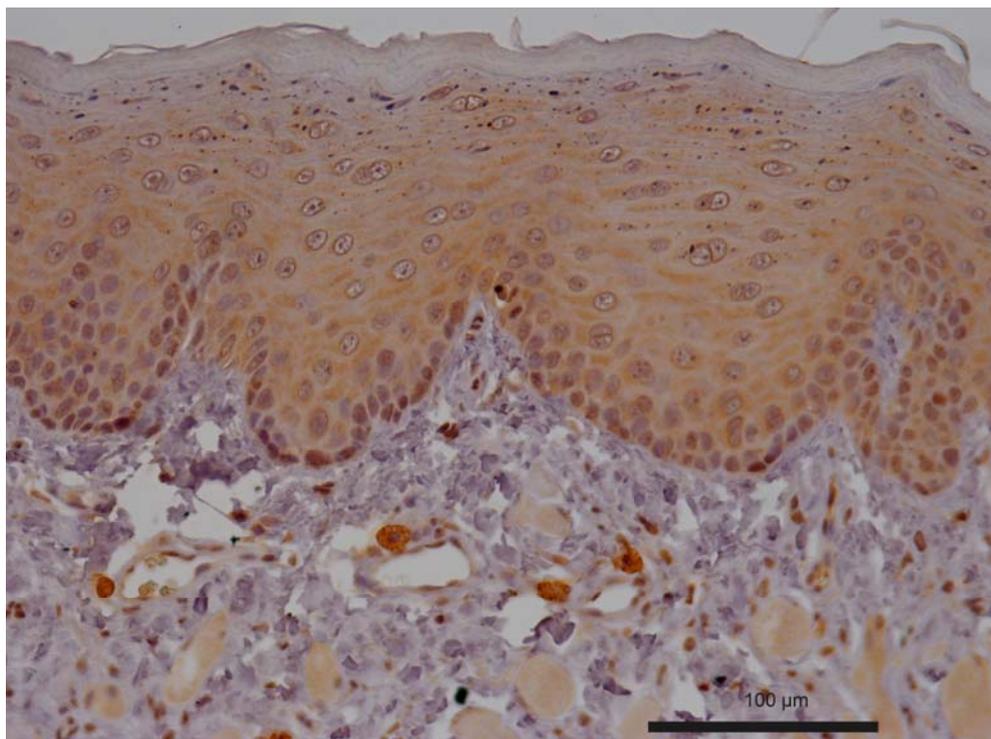


Fig.2. Imagem de marcação imunoistoquímica de survivin nas camadas basal e suprabasal (400x).

Morfometria

Não houve diferença significativa com relação à espessura epitelial entre os grupos deste estudo (Tabela 3).

Tabela 3. Espessura média do epitélio, do epitélio + camada de ceratina e da camada de ceratina (μm), nos grupos experimentais e controle.

Grupo	Epitélio sem ceratina		Epitélio com ceratina		Ceratina	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
Álcool Cessação do Consumo	108,35	20,52	121,53	22,213	14,84	4,23
Álcool uso Contínuo	92,55	35,44	105,93	38,34	13,39	5,52
Álcool uso Contínuo + Vitamina E+Tween	94,65	24,27	108,27	25,98	13,61	2,42
Vitamina E+Tween	113,44	24,89	132,14	26,12	18,69	3,42
Tween	100,35	29,98	118,58	33,13	18,24	4,64
Controle – Salina	106,72	24,12	122,84	25,10	16,11	4,13
P	0,637		0,555		0,099	

Anova

4 Discussão

A presença de survivin em todos os grupos indica que em situação fisiológica essa proteína poderia atuar como fator mantenedor da renovação celular. Esse efeito foi chamado de citoprotetor, uma vez que garante a integridade tecidual (Ham and Kaunitz, 2008; Jones et al., 2008).

Em malignidade, estudos mostraram aumento da expressão imunohistoquímica de survivin indicando a utilidade dessa proteína como marcador, principalmente em progressão de lesões cancerizáveis para carcinoma (Jane et al., 2006; Lo Muzio et al., 2003). Neste estudo observou-se que esses eventos não têm relação com a ação do álcool, enfatizando ser este um agente promotor, atuando na proliferação celular e não no bloqueio da apoptose. De certa forma, esses achados estão de acordo com Slomiany et al (1998) que observaram que o álcool em concentração alta atuou de forma pró apoptótica, sendo observado 37 vezes mais atividade de caspase-3 resultante da ingestão crônica de álcool (Slomiany et al., 1998a; Slomiany et al., 1998b). No presente estudo, foi possível observar que em concentração alta, o álcool não foi capaz de ativar a via anti apoptótica de survivin a qual é capaz de inibir a atividade de caspase-3, encontrada aumentada no estudo de Slomiany et al (1998).

A ausência de diferença significativa entre os grupos com relação à marcação de survivin pode ser explicada pela não ativação dessa via antiapoptótica devido à ingestão crônica de etanol na concentração de 40%. Essa concentração utilizada neste estudo é considerada alta. Na literatura, com relação à concentração do álcool foi observado, em mucosa gástrica, que o pré tratamento de animais com álcool 20% (concentração média) previamente ao tratamento com álcool 50%, desencadeou um aumento de survivin, sendo interpretado como um mecanismo citoprotetor. Entretanto, a forma de administração de álcool foi injeção intragástrica e o intervalo entre o pré tratamento e o tratamento foi apenas 30 minutos (Jones et al., 2008).

A não identificação de diferença com relação à survivin no presente estudo não significa que ingestão crônica de álcool 40% não causa dano. Esse dano pode ser causado pela ativação de outras vias (Carrard et al., 2009; Clemens et al., 2003). Contudo, é possível afirmar que ingestão crônica de álcool 40% não promove alteração de survivin, na camada supra basal, a qual havia sido identificada em estudos prévios

como a responsável pela manutenção da proliferação resultante da ingestão crônica de álcool (Carrard et al., 2004; Maito et al., 2003).

Com relação ao efeito do álcool na espessura epitelial os nossos achados discordam com os de Sanfelice et al (2003) e de Maier et al (1994) que observaram menor espessura epitelial em animais submetidos à ingestão de álcool quando comparados aos controles. Entretanto, é provável que o tempo de ingestão de álcool determine a menor espessura observada por esses autores. No estudo de Sanfelice et al (2003) e de Maier et al (1994) os tempos de avaliação foram de 6 meses, enquanto que neste estudo a avaliação foi feita após 4 meses de ingestão de álcool (Maier et al., 1994; Sanfelice, 2003). O tempo de avaliação foi baseado no fato de que o dano provocado pelo álcool envolve estresse oxidativo e sendo possível observar dano em menos de 4 meses através do estudo de rotas bioquímicas, optou-se por avaliar as alterações precoces provocadas pelo álcool de forma imunistoquímica e morfométrica (Carrard et al., 2009).

Com relação ao efeito da cessação de consumo de álcool na espessura epitelial não foram encontrados na literatura consultada estudos com esse tipo de análise. Apesar de não haver diferença significativa nos grupos aqui analisados, as médias dos grupos submetidos ao consumo de álcool foram as menores concordando com a diminuição de espessura observada em outros estudos (Maier et al., 1994; Sanfelice, 2003). Já a média do grupo álcool cessação foi a mais próxima da do grupo controle, sugerindo uma possível reversibilidade da diminuição de espessura.

5 Conclusão

Survivin está presente em condições fisiológicas nas células da mucosa lingual de ratos, e a quantidade de células com marcação imunoistoquímica para esta proteína não é alterada pela ingestão crônica de álcool. No tempo de 4 meses, a ingestão de álcool não provocou alteração na espessura epitelial. A ausência de diferença significativa entre os grupos impossibilitou a avaliação do co-tratamento com vitamina E e o efeito da cessação do consumo de álcool.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo equipamento de captura e software.

Referências

- Altieri DC (2003) Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* 22(53):8581-9.
- Ambrosini G, Adida C, Altieri DC (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3(8):917-21.
- Campos SC, Moreira DA, Nunes TD, Colepicolo P, Brigagao MR (2005) Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenosis. *Arch Oral Biol* 50(7):661-8.
- Carrard VC, Filho MS, Rados PV, Chaves AC, 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(2-3):233-8.
- Carrard VC, Pires AS, Mendez M, Mattos F, Moreira JC, Sant'Ana Filho M (2009) Effects of acute alcohol consumption and vitamin E co-treatment on oxidative stress parameters in rats tongue. *Food Chem Toxicol* 47(6):1058-63.
- Chiou SK, Moon WS, Jones MK, Tarnawski AS (2003) Survivin expression in the stomach: implications for mucosal integrity and protection. *Biochem Biophys Res Commun* 305(2):374-9.
- Clemens DL, Calisto LE, Sorrell MF, Tuma DJ (2003) Ethanol metabolism results in a G2/M cell-cycle arrest in recombinant Hep G2 cells. *Hepatology* 38(2):385-93.
- Freedman A, Shklar G (1978) Alcohol and hamster buccal pouch carcinogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 46(6):794-805.
- Fukuda S, Pelus LM (2001) Regulation of the inhibitor-of-apoptosis family member survivin in normal cord blood and bone marrow CD34(+) cells by hematopoietic growth factors: implication of survivin expression in normal hematopoiesis. *Blood* 98(7):2091-100.
- Gumus E, Solakoglu S, Mutus R, Altay B, Kiziler AR, Miroglu C (2005) Effect of acute alcohol intake on prostate tissue and serum PSA-like protein levels in rats. *Urol Int* 75(1):50-6.
- Ham M, Kaunitz JD (2008) Gastroduodenal mucosal defense. *Curr Opin Gastroenterol* 24(6):665-73.
- Institute of Laboratory Animal Research COLS, National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press, Washington, D.C.:140
- Jane C, Nerurkar AV, Shirsat NV, Deshpande RB, Amrapurkar AD, Karjodkar FR (2006) Increased survivin expression in high-grade oral squamous cell carcinoma: a study in Indian tobacco chewers. *J Oral Pathol Med* 35(10):595-601.

- Jones MK, Padilla OR, Webb NA, Norng M (2008) The anti-apoptosis protein, survivin, mediates gastric epithelial cell cytoprotection against ethanol-induced injury via activation of the p34(cdc2) cyclin-dependent kinase. *J Cell Physiol* 215(3):750-64.
- Kalender S, Kalender Y, Ogutcu A, Uzunhisarcikli M, Durak D, Acikgoz F (2004) Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology* 202(3):227-35.
- Krishnamurthy S, Bieri JG (1963) The Absorption, Storage, and Metabolism of Alpha-Tocopherol-C14 in the Rat and Chicken. *J Lipid Res* 4:330-6.
- Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Pezzetti F, Stabellini G, Laino G, Santarelli A, Pannone G, Bufo P, de Lillo A, Carinci F (2005) Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett* 225(1):27-33.
- Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, Staibano S, Mignogna MD, De Rosa G, Kudo Y, Takata T, Altieri DC (2003) Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *J Dent Res* 82(11):923-8.
- Maier H, Weidauer H, Zoller J, Seitz HK, Flentje M, Mall G, Born IA (1994) Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res* 18(2):387-91.
- Maito FL, Rados PV, Filho MS, Barbachan JJ, Quadros O (2003) Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of, or topical exposure to, alcohol. *Alcohol* 31(1-2):25-30.
- Marioni G, Bedogni A, Giacomelli L, Ferraro SM, Bertolin A, Facco E, Staffieri A, Marino F (2005) Survivin expression is significantly higher in pN+ oral and oropharyngeal primary squamous cell carcinomas than in pN0 carcinomas. *Acta Otolaryngol* 125(11):1218-23.
- McMillen BA, Crawford MS, Kulers CM, Williams HL (2005) Effects of a metabotropic, mglu5, glutamate receptor antagonist on ethanol consumption by genetic drinking rats. *Alcohol* 40(6):494-7.
- Moon WS, Tarnawski AS (2003) Nuclear translocation of survivin in hepatocellular carcinoma: a key to cancer cell growth? *Hum Pathol* 34(11):1119-26.
- Neves MM (1989) Concentração de Etanol em Bebidas Alcoólicas Mais Consumidas no Brasil. *Gastroenterologia Endoscopia Digestiva* 8(1): 17-20.
- Sanfelice JCP, D.M.P.; Sant'Ana Filho, M. (2003) Alterações morfológicas em epitélio lingual de camundongos expostos ao álcool etílico a 40o GL. . *R. Fac. Odontol.* 44(1):3-14.
- Seitz HK, Becker P (2007) Alcohol metabolism and cancer risk. *Alcohol Res Health* 30(1):38-41, 44-7.

- Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA (1998) Alcohol and cancer. *Recent Dev Alcohol* 14:67-95.
- Simanowski UA, Stickel F, Maier H, Gartner U, Seitz HK (1995) Effect of alcohol on gastrointestinal cell regeneration as a possible mechanism in alcohol-associated carcinogenesis. *Alcohol* 12(2):111-5.
- Simanowski UA, Suter P, Russell RM, Heller M, Waldherr R, Ward R, Peters TJ, Smith D, Seitz HK (1994) Enhancement of ethanol induced rectal mucosal hyper regeneration with age in F344 rats. *Gut* 35(8):1102-6.
- Slomiany BL, Piotrowski J, Piotrowski E, Slomiany A (1998a) Activation of apoptotic caspase-3 and nitric oxide synthase-2 in buccal mucosa with chronic alcohol ingestion. *Biochem Mol Biol Int* 45(6):1199-209.
- Slomiany BL, Piotrowski J, Piotrowski E, Slomiany A (1998b) Induction of buccal mucosal apoptosis with chronic alcohol ingestion. *Biochem Mol Biol Int* 44(2):381-9.
- Vincon P (2003) Inhibition of Alcohol-Associated Colonic Hyperregeneration by α -Tocopherol in the Rat. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 27(1):100-106.
- Zhang Y, Venugopal SK, He S, Liu P, Wu J, Zern MA (2007) Ethanol induces apoptosis in hepatocytes by a pathway involving novel protein kinase C isoforms. *Cell Signal* 19(11):2339-50.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo concluiu-se que survivin está marcado em situações fisiológicas na mucosa lingual, nas camadas basal e suprabasal, e não é alterado pelo consumo de álcool nessas camadas, reafirmando o álcool como promotor, uma vez que survivin é usado como marcador de carcinogênese. Observou-se também que, no período de análise deste estudo, 4 meses, não houve diferença na espessura epitelial entre os grupos experimentais e controle. O delineamento deste estudo foi experimental randomizado, em paralelo, cego, controlado e foi analisado o epitélio lingual de 43 ratos, divididos em 3 grupos com álcool (Álcool; Álcool Cessação; Álcool e Vitamina E) e 3 grupos sem álcool (Controle; Tween; Vitamina E).

Para um maior entendimento das alterações provocadas pelo álcool na mucosa bucal, a análise de outras vias de proliferação e apoptose são de interesse, bem como a observação de diferentes concentrações de álcool e diferentes tempos de consumo. Para uma completa análise da participação de survivin nas alterações provocadas pelo álcool na mucosa bucal seria interessante a observação das outras camadas epiteliais, que não foram observadas neste estudo. Futuros estudos com tempo de avaliação mais longo podem contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos nas vias proliferativas e apoptóticas.