

DÁRCIO KITAKAWA

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA PROTEÍNA INIBIDORA
DE APOPTOSE, SURVIVINA, NO PROCESSO DE
CARCINOGENESE QUIMICAMENTE INDUZIDA PELA 4NQO
(4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO) EM MUCOSA LINGUAL DE
RATOS *WISTAR***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Biopatologia Bucal.

DÁRCIO KITAKAWA

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA PROTEÍNA INIBIDORA
DE APOPTOSE, SURVIVINA, NO PROCESSO DE
CARCINOGENESE QUIMICAMENTE INDUZIDA PELA 4NQO
(4-NITROQUINOLINA 1-ÓXIDO) EM MUCOSA LINGUAL DE
RATOS *Wistar***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.

Orientador Prof. Adj. Luiz Antonio Guimarães Cabral

Co-orientador Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

2006

Apresentação gráfica e normalização de acordo com :

BELLINI, A.B.; SILVA, E.A. Manual para elaboração de monografias: **estruturas do trabalho científico. São José dos Campos: FOSJC/UNESP, 2002. 82p.**

KITAKAWA, D. **Estudo imunoistoquímico da proteína inibidora de apoptose, survivina, no processo de carcinogênese quimicamente induzida pela 4NQO (4-nitroquinolina 1-óxido) em mucosa lingual de ratos *Wistar*.** 2006, 80f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2006.

DEDICATÓRIA

A minha mãe LYDIA SUEKO YOKOYAMA KITAKAWA e especialmente ao meu pai CHIOZO KITAKAWA, exemplos de vida para mim. Toda a gratidão, orgulho e amor que tenho por vocês não podem ser expresso em palavras.

A minha esposa, LIA MIYASAWA KITAKAWA, mulher da minha vida, sou extremamente feliz ao seu lado. Todo este trabalho só foi possível graças ao seu irrestrito apoio, principalmente nas horas em que quase tudo parecia perdido..

Aos meus irmãos DALTON E DALBER KITAKAWA, sou eternamente grato pelo privilégio de ter uma família tão unida e amiga.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, PROF. ADJ. LUIZ ANTONIO GUIMARÃES CABRAL, sábio Mestre, sou eternamente grato ao convívio e ensinamentos proporcionados durante estes 5 anos de amizade. Sua filosofia e ensinamentos serão multiplicados por mim pelo resto de minha vida.

Ao meu co-orientador, PROF. DR. DANIEL ARAKI RIBEIRO, pesquisador ímpar, idealizador e grande responsável pela realização deste trabalho, sou um admirador da sua ânsia e incessante busca do saber.

AGRADECIMENTOS

Ao diretor PROF ADJ PAULO VILLELA SANTOS JÚNIOR, em nome da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos UNESP, pela oportunidade de realização do curso;

Aos professores do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPATOLOGIA BUCAL, pela oportunidade de engrandecimento pessoal e profissional;

A PROFA. DRA. JANETE DIAS ALMEIDA, professora-amiga, que proporcionou e continua proporcionando um convívio fraternal o qual guardo com muito carinho;

Aos professores da disciplina de Propedêutica Estomatológica, ANA SUELI e WALTER, pela amistosa convivência;

Aos professores do TOXICAN – Departamento de Patologia da F.M. Botucatu - UNESP: MARIANGELA ESTHER ALENCAR e DAISY MARIA FÁVERO SALVADORI, pela gentileza em permitir o uso das dependências do departamento que possibilitou a realização deste trabalho;

A professora MARIA APARECIDA CUSTÓDIO DOMINGUE pela gentileza na cessão dos anticorpos da survivina ;

À bibliotecária ÂNGELA BELLINI, pela prestatividade e árduo trabalho de revisão bibliográfica;

Às secretárias da Pós-graduação, ROSE, ERENA e CIDADINHA, por todo apoio durante estes 5 anos de São José dos Campos;

Aos amigos do curso de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, em especial, FERNANDO, ELAINE, PATRÍCIA e LUCIA, pelos momentos de convivência;

Aos meus sogros, ALICE e MITSUO MIYASAWA, minha segunda família;

Aos ANIMAIS, cujas vidas propiciam o progresso do conhecer;

À CAPES pelo financiamento parcial deste projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE TABELAS.....	08
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	09
RESUMO.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Carcinoma epidermóide.....	14
2.2 Carcinogênese.....	16
2.3 Carcinogênese química.....	21
2.4 Modelos animais.....	25
2.5 Apoptose.....	28
2.6 Survivina.....	31
3 PROPOSIÇÃO.....	37
4 MATERIAL E MÉTODO.....	38
4.1 Análise histopatológica.....	39
4.2 Imunoistoquímica.....	39
4.3 Análise imunoistoquímica.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Análise histopatológica.....	43
5.2 Análise imunoistoquímica.....	45
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÕES.....	56
8 REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS.....	77
<i>ABSTRACT</i>	79

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Fotomicrografia mostrando mucosa bucal normal da região posterior da língua do grupo controle. Note o epitélio dorsal (ED), lâmina própria (seta), músculo (Ms) e abaixo glândulas mucosas (M) e serosas (S). Barra=110µm..... 45
- FIGURA 2 Análise histopatológica durante a evolução da carcinogênese (H.E.): a) mucosa lingual do dorso da língua normal; b) hiperplasia e hiperqueratose sem atipia; c) hiperplasia e hiperqueratose com atipia discreta; d) hiperplasia e hiperqueratose com atipia moderada; e) hiperplasia e hiperqueratose com atipia grave; f) carcinoma *in situ*; g) carcinoma epidermóide microinvasivo; h) Carcinoma epidermóide bem diferenciado..... 47
- FIGURA 3 Análise imunoistoquímica durante a evolução da carcinogênese (survivina) X 400: a) controle negativo com ausência de marcação; b) 4 semanas pós-tratamento com a 4NQO, demonstrando marcação citoplasmática nas camadas superficiais do epitélio; c) 12 semanas de tratamento com a 4NQO, demonstrando marcação nas camadas superficiais do epitélio de uma lesão classificada histopatologicamente como hiperplasia com atipia; d) 20 semanas de tratamento com a 4NQO, demonstrando marcação em áreas de disqueratose numa lesão classificada como carcinoma epidermóide bem diferenciado..... 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Incidência dos quadros histopatológicos do modelo de carcinogênese bucal induzidos pela (4NQO) ^a , em mucosa de língua de ratos ⁹⁶	44
Tabela 2 -	Número de casos com expressão da survivina de acordo com o quadro histopatológico, seguindo a administração da 4NQO na dose de 50 ppm.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT = Associação Brasileira de Normas Técnicas

AHH = aril-hidrocarboneto hidroxilase

BIR = do inglês “Baculoviral IAP repeat”, traduzido como repetições IAP do baculovírus

cDNA = DNA complementar

CE = carcinoma epidermóide

c-onc = c-oncogenes

d.C. = Depois de Cristo

DMBA = 9,10-dimetil-1,2- benzantraceno ou 7,12-dimetilbenzantraceno

DAB = diaminobenzidina

DNA = do inglês “Desoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucléico

FOSJC = Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

H.E. = Hematoxilina e Eosina

HPV = do inglês “Human Papilloma Virus”, traduzido como Papilomavírus Humano

IAP = do inglês “Inhibitor of apoptosis protein”, traduzido como proteína inibidora de apoptose

Ig G = imunoglobulina G

INCa = Instituto Nacional do Câncer

Kb = kilobases

mL = mililitro

M = molar

OMS = Organização Mundial da Saúde

PAHs = do inglês “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons”, traduzido como Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

PBS = solução tampão fosfato

PCNA = do inglês “Proliferating Cell Nuclear Antigen”, traduzido como
antígeno nuclear de proliferação celular

ppm = partes por milhão

4NQO = 4 nitroquinolina 1-óxido

RNA = do inglês “Ribonucleic Acid”, traduzido como ácido ribonucléico

RNA_m = RNA mensageiro

3,4 BP = 3,4 benzopireno

UICC = União Internacional de Combate ao Câncer

UNESP = Universidade Estadual Paulista

USA = do inglês “United States of América”, traduzido como Estados
Unidos da América

20 MC = 20 metilcolantreno

v-onc = v-oncogenes

W = watts

% = porcentagem

µm = micrômetro

° C = graus Celsius

KITAKAWA, D. **Estudo imunoistoquímico da proteína inibidora de apoptose, survivina, no processo de carcinogênese quimicamente induzida pela 4NQO (4-nitroquinolina 1-óxido) em mucosa lingual de ratos Wistar** 2006, 80f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2006.

RESUMO

A carcinogênese em mucosa lingual de rato induzida pela 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO) é um modelo interessante para o estudo da evolução do carcinoma epidermóide fase por fase. Considerando-se que a apoptose tem um papel importante na carcinogênese, o objetivo deste trabalho foi investigar a expressão da survivina, membro da família das proteínas inibidoras de apoptose, através da imunoistoquímica, durante o ensaio de carcinogênese lingual induzida pela 4NQO. Ratos Wistar do sexo masculino foram divididos em três grupos de 10 animais cada e tratados com 50 ppm de 4NQO na água de beber durante quatro, 12 e 20 semanas. Um total de 10 animais foi utilizado como controle negativo. Embora não tenha sido observada alteração histopatológica após 4 semanas de exposição ao carcinógeno, detectou-se survivina no citoplasma das células das camadas granulares e superficiais do epitélio. Nas lesões com atipias após 12 semanas de exposição ao carcinógeno, observou-se survivina citoplasmática apenas na camada superficial do epitélio. Nos carcinomas epidermóides bem diferenciados induzidos após 20 semanas de tratamento com a 4NQO, detectou-se a expressão de survivina citoplasmática nas células adjacentes as pérolas córneas. Não houve imunorreatividade no grupo controle negativo. Diante destes achados, os resultados sugerem que a expressão da survivina citoplasmática é um evento inicial durante a carcinogênese lingual de ratos induzida pela 4NQO, e pode ser uma ferramenta interessante para a identificação de lesões com grande risco de progredir para carcinoma epidermóide das estruturas de revestimento bucal.

PALAVRAS-CHAVE: 4-nitroquinolina 1-óxido; survivina; carcinoma de células escamosas; animais; estudo comparativo.

1 INTRODUÇÃO

De 90 a 96% de todas as neoplasias malignas de boca são representadas pelos carcinomas epidermóides (PINTO & CAVALARI⁸⁷, 2002). Assim, o carcinoma epidermóide (CE) tem papel importante dentre as doenças que acometem o complexo maxilo-mandibular, uma vez que, se não realizado um diagnóstico precoce, é grande a probabilidade de culminar com a morte do paciente.

Desde o trabalho de Salley¹⁰⁰(1954), primeiro a desenvolver um modelo animal de carcinogênese intrabucal, muitos outros trabalhos têm sido desenvolvidos para um melhor entendimento, tanto dos mecanismos da carcinogênese, como também dos fatores etiológicos, prognósticos e de tratamento das neoplasias malignas das estruturas de revestimento da boca (MOGNETTI et al.⁷⁵, 2006).

Dentre os animais de laboratório, os ratos têm sido amplamente utilizados como modelos de carcinogênese experimental intrabucal, sendo o carcinógeno administrado a 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO), agente alquilante que funciona como carcinógeno completo, isto é, induz a iniciação e a progressão neoplásica (VERED et al.¹²¹, 2004).

A agressividade do CE no complexo maxilo-mandibular reflete-se na sua capacidade proliferativa, na sua capacidade de invasão de outros tecidos e na sua capacidade de gerar metástases. Os exames histopatológicos de rotina costumam ser bastante subjetivos quanto à definição do grau de malignidade dessas lesões, muitas vezes dificultando a avaliação do prognóstico e de sobrevida do paciente.

Técnicas de histoquímica e imunoistoquímica vêm sendo empregadas como marcadores das atividades proliferativas e apoptóticas do CE. A utilização destes marcadores tem sido importante no entendimento das alterações celulares, e tem possibilitado diferenciar

estágios de atividade e graus de malignidade de várias doenças, tornando os exames mais precisos (JORDAN et al.⁴⁵, 2002).

A survivina é uma proteína pertencente a família das proteínas inibidoras de apoptose (IAP – do inglês *Inhibitor of Apoptosis Protein*), e o aumento da sua expressão nas neoplasias tem sido relacionada à resistência apoptótica (GROSSMAN et al.³⁷, 2001), além de estar vinculada com um pior prognóstico, diminuição da resposta terapêutica da neoplasia aos tratamentos radio e quimioterápicos, e maior agressividade da lesão (REED⁹⁴, 2001).

Diante do exposto e da escassez de estudos imunoistoquímicos na carcinogênese experimental em mucosa bucal de ratos *Wistar*, torna-se válido avaliar as marcações imunoistoquímicas, fazendo uso dos anticorpos contra a survivina, proteína inibidora de apoptose (IAP), no modelo de carcinogênese experimental em mucosa bucal de ratos *Wistar*, utilizando-se a 4NQO dissolvida na água de beber, como carcinógeno.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide

O carcinoma epidermóide (CE) que acomete as estruturas de revestimento da boca é a sexta neoplasia maligna mais prevalente. (PARKIN et al.⁸⁶, 2005). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCa), no Brasil a boca é a sexta localidade mais atingida por neoplasias malignas entre os homens, e a oitava, entre as mulheres. Observa-se uma estimativa de aproximadamente 13.470 novos casos em nosso país para o ano de 2006 (BRASIL¹⁵, 2006).

Cerca de 90% de todas as neoplasias malignas do complexo maxilo-mandibular é constituída pelos CE (DÖBROSSY²⁷, 2005). O CE cujo epitélio neoplásico assemelha-se ao da epiderme, também é denominado carcinoma espino-celular e carcinoma de células escamosas (NEVILLE et al.⁸⁰, 1998; TOMMASI¹²⁰, 2002).

Certas substâncias contidas no tabaco, fumado ou não, estão relacionadas a várias doenças, entre as quais o câncer bucal, os quais poderiam ser prevenidos com a restrição da exposição a estas substâncias (JEFFERIES & FOULKES⁴², 2001; AMERICAN SOCIETY OF ONCOLOGY⁸, 2003). Além do tabaco, outro fator ambiental muito importante na etiologia do CE é o álcool, funcionando de maneira sinérgica ao tabaco (CLOOS et al.¹⁸, 1996; JEFFERIES & FOULKES⁴², 2001; DÖBROSSY²⁷, 2005; STEWART & COATES¹¹³, 2005).

O CE que acomete a boca apresenta altos índices de recorrência e metástases, fatores estes que possuem influência direta na sobrevida, bem como na qualidade da vida dos pacientes que não foram a óbito. Destarte, o diagnóstico precoce é de fundamental importância,

uma vez que pode direcionar o destino do paciente para a cura desta enfermidade (KANOJIA & VAIDYA⁴⁶, 2006).

Dentre as estratégias para o combate do aumento da incidência do CE, pode-se destacar a prevenção primária, através da mudança no estilo de vida dos pacientes, como os tratamentos para o vício do cigarro e do álcool (CLOOS et al.¹⁸, 1996; DÖBROSSY²⁷, 2005), e a quimioprevenção, relacionada com o emprego de substâncias capazes de retardar, ou mesmo inibir o processo de carcinogênese (SUN et al.¹¹⁴, 2004; LIPPMAN et al.⁶⁰, 2005).

Parâmetros como o tamanho da lesão, comprometimento de linfonodos regionais e metástases à distância são fatores determinantes a serem considerados quando o clínico se depara com um paciente acometido por uma neoplasia maligna. A quantificação e a qualificação destes fatores recebe o nome de estadiamento clínico. A utilização do estadiamento preconizado pela União Internacional de Combate ao Câncer (UICC), órgão da Organização Mundial de Saúde (OMS) é consagrada na literatura mundial. Este sistema conhecido internacionalmente como TNM, avalia clinicamente o tamanho da lesão e a presença ou não de invasão às estruturas adjacentes (T), envolvimento ou não de linfonodos regionais (N) e a presença ou não de metástase (M). A somatória destes itens determina o estágio da neoplasia (SOBIN et al.¹¹⁰, 1997).

O CE que acomete as estruturas de revestimento bucal é um processo que envolve várias etapas, resultando em alterações genéticas, epigenéticas e metabólicas, conseqüentes à exposição aos carcinógenos ambientais (LIPPMAN et al.⁶⁰, 2005).

2.2 Carcinogênese

Para uma adequada conceituação e compreensão das neoplasias malignas é primordial o conhecimento atualizado dos mecanismos celulares relacionados com o ciclo celular normal, uma vez que a perda da homeostasia pode gerar o desenvolvimento do processo da carcinogênese.

Chama-se carcinogênese o processo de conversão de uma célula normal em uma célula maligna, sendo que os agentes indutores desse processo são denominados carcinógenos (WILLIAMS¹³¹, 2001; LOUREIRO et al.⁶⁵, 2002).

Em espécies multicelulares, o ciclo de divisão celular é fundamental, sendo essencial tanto à proliferação e diferenciação celular, quanto à substituição de células danificadas, as quais se tornaram deficientes funcionalmente, ou que foram perdidas pelo processo de apoptose. Embora o processo de renovação e a morte celular pareçam ser opostos e contraditórios, os dois processos possuem alguma relação, isto é, muitas proteínas promotoras da proliferação celular possuem também atividades pró-apoptóticas (EVAN & LITTLEWOOD²⁹, 2001).

A replicação do DNA e a posterior segregação dos cromossomos em duas células filhas são as fases mais importantes do processo de divisão celular. Ocorrendo falhas nestas fases, provavelmente as células oriundas desta divisão poderão apresentar alterações no seu conteúdo genético, que podem ser perpetuadas pelas gerações de células futuras (OMELYANCHUK et al.⁸⁵, 2004).

Dois períodos que se repetem constantemente no ciclo celular, sendo eles a interfase e a mitose (fase M), constituem o processo básico de divisão celular. O período que se caracteriza por uma intensa atividade biossintética, sendo o mais longo do ciclo, é denominado interfase; que foi subdividida pelos pesquisadores em três fases: G1, S e

G2. A fase G1 (G = do inglês *gap*: intervalo) corresponde ao intervalo entre o término da mitose e o início da síntese de DNA, ocorrendo a síntese de RNA e de proteínas, com recuperação do volume normal da célula, que foi reduzido à metade na mitose. Na fase S ocorre a síntese de DNA e a duplicação dos centríolos. E na fase G2 as células acumulam energia para ser utilizada durante a mitose e sintetizam tubulina para formar os microtúbulos do fuso mitótico. Já as células do tecido que não se renovam saem do ciclo celular e passam para a fase G-zero (TESSEMA et al.¹¹⁶, 2004).

A mitose propriamente dita ou fase M é o período mais curto do ciclo celular, ocorrendo a condensação dos cromossomos e o seu alinhamento no fuso mitótico, terminando com a separação das cromátides irmãs, recebendo cada célula filha um jogo cromossômico igual ao da célula mãe (OMELYANCHUK et al.⁸⁵, 2004).

O ciclo celular é dependente tanto do ambiente extracelular quanto do intracelular, respondendo a sinais transmitidos por fatores de crescimento, hormônios, fatores de adesão celular, entre outras proteínas (GOODGER et al.³⁵, 1997; MICHALIDES⁷³, 1999); proteínas as quais regulam a atividade de outras, ativando-as ou inibindo-as, proporcionando o desenvolvimento do ciclo celular (ALBERTS et al.³, 1994; SHEER¹⁰⁸, 1996).

Intracelularmente, interrupções em pontos de controle estratégicos denominados pontos de checagem (do inglês *checkpoints*), que acontecem entre as fases G1 e S, G2 e M, têm a finalidade de impedir a perpetuação de algum dano genético (OMELYANCHUK et al.⁸⁵, 2004). Os pontos de checagem são sinais internos da célula que asseguram que os estágios do ciclo celular tenham sido corretamente completados antes do próximo estágio de divisão iniciar (ALBERTS et al.³, 1994; GOODGER et al.³⁵, 1997; MICHALIDES⁷³, 1999). O desenvolvimento da maioria das neoplasias está relacionado com a

mutação do gene p 53, que é responsável pelo ponto de checagem entre as fases G1 e S (OMELYANCHUK et al.⁸⁵, 2004).

Normalmente, as células proliferam somente quando novas células são necessárias. Contudo as células neoplásicas proliferam independentemente da necessidade de renovação celular; isso denota que mutações importantes aconteceram em genes que codificam proteínas reguladoras do ciclo celular (LOURO⁶⁷, 2002).

Vários são os genes que, quando alterados, participam de processos carcinogênicos. Em condições normais esses genes desempenham importantes papéis em vias relacionadas à ativação ou à proliferação celular (SABBAGA⁹⁹, 2000; NAGPAL & DAS⁷⁹, 2003).

Durante a carcinogênese, existem três classes de genes principalmente envolvidos com o desenvolvimento da neoplasia: proto-oncogenes e genes supressores de neoplasia (PITOT⁸⁸, 1993; TESSEMA et al.¹¹⁶, 2004), somando-se os genes reguladores da apoptose e os genes de reparo do DNA(WEISS¹³⁰, 2000).

Os proto-oncogenes promovem a proliferação celular ordenada (TODD et al.¹¹⁹, 1997). Nas células normais, a expressão desses genes é rigorosamente regulada. Numa célula maligna, esta progressão ordenada (ciclo celular, mitose e diferenciação) é parcialmente alterada ou perdida, quando um ou mais proto-oncogenes é mutado para oncogene (NAGPAL & DAS⁷⁹, 2003).

Oncogenes podem resultar de mutações ou deleções ocorridas em proto-oncogenes, sendo denominado *c-oncogenes* (*c-onc*); ou podem ser decorrentes de transduções virais, sendo então denominados *v-oncogenes* (*v-onc*). Na presença de danos graves e irreparáveis no DNA, a preponderância dos oncogenes em relação aos proto-oncogenes podem inibir a apoptose (LOURO⁶⁶, 2002).

Enquanto os proto-oncogenes promovem a proliferação celular ordenada, a atuação dos genes supressores de neoplasia mantém essa proliferação sob controle, restringindo o crescimento celular,

funcionando assim como um antagonista direto ou indireto da função dos proto-oncogenes (TESSEMA et al.¹¹⁶, 2004).

Diversos genes supressores de neoplasias participam dos pontos de verificação, e a inativação ou deleção deles parecem ser uma das principais causas da perda da estabilidade genética, as quais permitem o acúmulo de erros, sem a indução de sistemas de reparo, sem interrupção do ciclo ou apoptose (THOMPSON¹¹⁷, 1995). Estes genes podem ser inativados por diversos mecanismos, dentre os quais, mutações pontuais, deleções, ligações com proteínas virais ou celulares (NAGPAL & DAS⁷⁹, 2003).

O entendimento da carcinogênese baseia-se na compreensão dos eventos que acontecem num aspecto temporal e podem ser divididos em três estágios: iniciação, promoção e progressão (WEINBERG¹²⁸, 1989; MORI et al.⁷⁷; 1999; SUN et al.¹¹⁴, 2004).

A iniciação é causada por uma alteração irreversível do DNA, podendo ser proporcionada pela reação desta molécula com substâncias carcinogênicas (PITOT⁸⁸, 1993; LOUREIRO et al.⁶⁵, 2002). Além dessa alteração do DNA, é necessário que haja a proliferação celular, de modo que a mutação inicial seja perpetuada (WILLIAMS¹³¹, 2001).

Mutação é a alteração do material genético que resulta em erros na duplicação, no reparo e na recombinação do DNA (BOSSO & FROES¹³, 2002). As mutações podem ocorrer espontaneamente, originando-se como resultado do próprio metabolismo celular, ou por meio das interações com o meio ambiente pela ação de agentes físicos, químicos e/ou biológicos (WEISBURGER¹²⁹, 1994). Nos organismos multicelulares, a mutação em células somáticas pode provocar danos irreparáveis em genes que regulam a proliferação celular, proporcionando o desenvolvimento de neoplasias malignas (EVAN & LITTLEWOOD²⁹, 2001).

Em homeostasia as células lançam mão de mecanismos fisiológicos de defesa, como detoxificação dos carcinógenos, reparo do DNA e da ação deletéria que as células em mutação, ou já mutadas, poderiam exercer; perfazendo assim uma linha orgânica de defesa importante contra a iniciação das neoplasias (WEINBERG¹²⁸, 1989; HARTWELL & KASTAN⁴⁰, 1994; SCHWARTZ et al.¹⁰⁴, 2000).

As variações dos processos acima descritos podem ser observadas em indivíduos diferentes, desempenhando um papel crucial na carcinogênese ambiental, demonstrando a variabilidade da resposta entre indivíduos (ROSSIT & FROES⁹⁸, 2002).

O segundo estágio é conhecido como promoção, e nessa fase o estímulo da divisão celular parece ser um componente importante (PITOT⁸⁸, 1993). A promoção envolve a seleção e expansão das células iniciadas; nesta etapa, o material genético alterado da célula iniciada modifica a expressão dos genes que regulam a diferenciação e o crescimento celular. Essa fase pode ser reversível através da atuação de uma gama de mecanismos, entre eles, a apoptose, também conhecida como morte celular programada e a ação da defesa imunológica, além da quimioprevenção (SUN et al.¹¹⁴, 2004).

Na seqüência, o processo pode caminhar para o estágio final que é chamado progressão, que possui caráter irreversível e se caracteriza pela instabilidade cariotípica (anaploidia) e o desenvolvimento da neoplasia maligna instalada. Ocorre uma perda no controle do crescimento celular, invasão de tecidos adjacentes e o desprendimento de células neoplásicas propiciando as metástases (PITOT⁸⁸, 1993).

Hanahan & Weinberg³⁹ (2000) sugeriram que o genótipo de uma célula neoplásica se relaciona com seis alterações essenciais na fisiologia celular, as quais em conjunto levam ao desenvolvimento da neoplasia, sendo elas: auto-suficiência nos sinais de crescimento com insensibilidade aos sinais inibitórios do crescimento; fuga da apoptose;

potencial de replicação ilimitado; angiogênese sustentada; invasão tecidual e, por último, metástase.

Os carcinógenos são geralmente substâncias eletrofilicas, desta forma, são atraídos por sítios moleculares de alta densidade eletrônica, como as bases nitrogenadas que fazem parte do DNA, e assim formando adutos (WILLIAMS¹³¹, 2001). Esses por sua vez, são capazes de promover a mutação dos genes supressores de neoplasias e dos proto-oncogenes em oncogenes, iniciando o processo de carcinogênese (LOUREIRO et al.⁶⁵, 2002).

2.3 Carcinogênese química

Na carcinogênese devem ser considerados fatores físicos e biológicos, os quais podem agir de maneira isolada ou conjunta (PITOT⁸⁸, 1993).

Entre os agentes físicos existem formas de energia que possuem propriedades carcinogênicas, das quais se destacam as radiações eletromagnéticas, e dentre elas as mais importantes são a radiação ultravioleta e a radiações ionizantes (raios x, gama) e, assim sendo, são os mais conhecidos e estudados (BOSSO & FROES¹³, 2002).

O entendimento da carcinogênese biológica está bem estabelecido em casos de câncer do cérvix uterino, na qual existe relação causa/efeito da ação do vírus do papiloma humano (*human papilloma vírus* – HPV) (BOSH et al¹². 2002).

Para uma determinada substância ser considerada carcinogênica deve ser capaz de interagir com os componentes celulares, como as proteínas, lipídios e, principalmente, com o material genético representado pelos ácidos nucleicos, DNA e RNA (WEISBURGER¹²⁹, 1994).

Além dos fatores anteriores, as substâncias químicas capazes de induzir o genoma celular às alterações que culminam com a carcinogênese, são classificadas como carcinógenos ou substâncias carcinogênicas (LOUREIRO et al.⁶⁵, 2002).

Existem três tipos de carcinógenos químicos, aqueles cujas estruturas moleculares permitem ação direta com o material genético, conhecidos como carcinógenos de ação direta; os caracterizados por substâncias que dependem da ativação metabólica prévia, denominados carcinógenos de ação indireta, e, finalmente, os carcinógenos epigenéticos ou não genotóxicos, os quais parecem não reagir com o material genético das células (WILLIAMS¹³¹, 2001).

Poucos são os carcinógenos que têm ação direta, estes possuem um potencial de reatividade elevado, o que faz com que sejam bastante instáveis. Exemplos destes compostos são: metil-metano sulfonato, ciclofosfamida, etc. Essas substâncias levam a alquilação de macromoléculas celulares, sempre na posição sete da guanina nos ácidos nucleicos, sem a necessidade de ativação metabólica. A maioria dos carcinógenos de ação direta não representa risco expressivo para a população em geral, uma vez que a reatividade elevada destes compostos pode fazer com que os mesmos sejam neutralizados pela reação com água ou sejam metabolizados antes de reagirem com receptores celulares importantes (WEISBURGER¹²⁹, 1994). Apesar do exposto, estas substâncias têm sido muito estudadas, principalmente devido às propriedades terapêuticas que as mesmas vêm demonstrando tanto no tratamento quimioterápico das neoplasias, quanto no tratamento de algumas doenças imunológicas – por exemplo, artrite reumatóide e granulomatose de Wegener (KUMAR et al.⁵⁵, 2005).

Já os carcinógenos de ação indireta são mais estáveis no meio ambiente que os anteriores, isso faz com que haja um maior contato com a população em geral. Estes agentes também são chamados de pró ou pré-carcinógenos, e requerem uma ativação metabólica prévia à

interação com macromoléculas celulares. Como a ação destes dependerá de ativações prévias existem diferenças nas ações em relação à espécie, sexo, idade, dieta, presença ou ausência de enzimas indutoras ou inibidoras, estado imunológico, entre outros fatores. Por exemplo, os homens e mulheres podem ter respostas diferentes aos carcinógenos, fenômeno que pode estar relacionado com uma maior ou menor quantidade de enzimas indutoras nos homens, o que diferiria a resposta frente a uma determinada substância nas mulheres. Recém-nascidos geralmente são mais sensíveis aos carcinógenos porque geralmente possuem níveis mais baixos de enzimas que detoxificam os mesmos (WEISBURGER¹²⁹, 1994).

A reação metabólica inicial dos carcinógenos faz com que haja produtos de detoxificação, ou formas próximas do composto ativado, ou ainda a forma reativa do carcinógeno. O sistema enzimático responsável pela maioria das reações metabólicas é o sistema P-450 (KUMAR et al.⁵⁵, 2005).

Os carcinógenos genotóxicos reagem diretamente com o material genético celular, ou são convertidos pelo metabolismo em reagentes intermediários que posteriormente formam adutos com o material genético. Sendo os carcinógenos de ação direta e indireta pertencentes a esta classe (WILLIAMS¹³¹, 2001).

Já os carcinógenos não genotóxicos ou epigenéticos parecem não reagir com o DNA, embora possam formar adutos com outros constituintes celulares. Um exemplo desses compostos é o ácido tricloroacético (WEISBURGER¹²⁹, 1994). Certos genes supressores de neoplasia podem ser inativados não pelas alterações estruturais, mas pela hipermetilação ocasionada por seqüências promotoras sem modificações na seqüência do DNA, o que caracteriza modificações epigenéticas (YAKUSHIJI et al.¹³⁴, 2003).

Dentre as substâncias químicas que possuem ação carcinogênica, um grupo recebe destaque especial, os hidrocarbonetos

aromáticos policíclicos (*polycyclic aromatic hydrocarbons* – PAHs), os quais são encontrados em abundância no ambiente ocupacional e doméstico (DIGIOVANNI²⁶, 1994).

Resumidamente, o metabolismo dos PAHs é mediado pela aril-hidrocarboneto hidroxilase (AHH) – uma das muitas monoxigenases de função mista – que participam das reações de ativação metabólica da fase I do metabolismo celular. Uma vez em contato com o organismo, esses compostos são oxidados a epóxidos (metabólitos primários), que são efetivamente inativados pela formação de conjugados, com pouca ou nenhuma oportunidade de reagirem com o DNA. No entanto, se esse epóxido for hidratado a diidrodiol em um evento metabólico secundário, o mesmo composto sofre nova oxidação (terceiro passo metabólico), dando origem ao diidrodiol epóxido, forma genotóxica final altamente reativa e, portanto, com grande facilidade de reação com o DNA (BOSSO & FROES¹³, 2002).

No que se refere à ligação dos PAHs ao DNA mais de 90% se dá por alquilação causada pela forma genotóxica final originada no metabolismo da maioria dos PAHs, ocorrendo no grupo amino exocíclico da guanina (COLON et al.¹⁹, 1999).

Um carcinógeno bastante empregado na carcinogênese experimental quimicamente induzida é a 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO), agente alquilante, com a capacidade de induzir estresse oxidativo, contribuindo para a morte ou mutagênese da célula a qual teve contato. É classificado como carcinógeno indireto, pois é necessária uma ativação metabólica prévia para derivar a 4-hidroxi-aminoquinolina 1-óxido, a qual seguida por uma acetilação, resulta em composto com afinidade pelo DNA, formando monoadutos quinolina-purina estáveis nas posições exocíclicas N-2 da guanina e N-6 da adenina (RAMOTAR et al.⁹⁰, 1998). Assim como outros carcinógenos presentes no tabaco, os produtos metabólicos da 4NQO ligam-se ao DNA predominantemente na região de guanina (KANOJIA & VAIDYA⁴⁶, 2006).

2.4 Modelos animais

As tentativas iniciais para a produção de carcinogênese experimental intrabucal fracassaram, sendo a mucosa bucal considerada mais resistente à ação de carcinógenos químicos, comparando-se com a pele, local este que se obtinha, com certa facilidade, carcinomas, pincelando a área com alcatrão de carvão (EVESON³⁰, 1981).

Salley¹⁰⁰ (1954) foi o pioneiro na indução de carcinomas experimentais intrabucais, quando investigava os efeitos dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos na mucosa da bolsa jugal de hamsteres. O autor utilizou o 9-10 dimetil 1,2 benzantraceno (DMBA), o 20 metil-colantreno (20MC) e o 3,4 benzopireno (3,4 BP) dissolvidos em acetona ou benzeno. Estes agentes foram pincelados na bolsa de bochecha três vezes por semana, durante dezesseis semanas e posteriormente os animais foram observados por mais nove semanas. O DMBA dissolvido em acetona mostrou-se o mais efetivo, e o primeiro carcinoma apareceu após sete semanas de aplicação.

Num trabalho posterior, Salley¹⁰¹ (1957) descreveu mudanças iniciais ocorridas na mesma mucosa de bolsa jugal de hamsteres, após o pincelamento de DMBA. Histologicamente, a mucosa bucal passou por quatro estágios antes da transformação maligna, sendo eles: inflamação, degeneração caracterizada pela necrose, regeneração e hiperplasia. Observou macroscopicamente a formação de placas brancas semelhantes a leucoplasia bucal em humanos, as quais se desenvolveram após oito ou nove aplicações de DMBA.

A mucosa bucal dos hamsteres como um todo tem uma resistência maior à ação dos carcinógenos químicos em relação à mucosa da bolsa jugal. Salley¹⁰⁰ (1954) encontrou carcinomas ocasionalmente na região de palato, língua, esôfago e estômago, provavelmente resultado de um derramamento do carcinógeno nestas áreas, quando da aplicação. O

modelo de maior sucesso na indução de carcinogênese lingual em hamsteres foi desenvolvido por Fujita et al.³² (1973), autores que aplicaram DMBA em bordo lingual, posterior a uma raspagem e ulceração da área com broca utilizada em endodontia. Todos os animais desenvolveram CE num período que variou entre 13 e 25 semanas.

Sucedendo os trabalhos de Salley¹⁰⁰ (1954) e Fujita et al.³² (1975), muitos outros autores utilizaram os hamsteres como modelos experimentais, utilizando principalmente o DMBA como carcinógeno, e fazendo a indução em mucosa da bolsa de bochecha e de bordo lingual (MORRIS⁷⁸, 1961; AL-ANI & SHKLAR², 1966; DACHI²¹, 1967; MAREFAT & SHKLAR⁷¹, 1977; MAREFAT⁷⁰, 1985; KITAKAWA⁵², 2003; MAGALHÃES⁶⁸, 2004; MONTEIRO⁷⁶, 2004)

Além dos hamsteres, outros animais têm sido utilizados: como os camundongos (LEVY, 1958⁵⁷; GOLDBERGER³⁴, 1957; PROTZEL et al.⁸⁹, 1964; STEIDLER & READE¹¹¹⁻², 1984 e 1986) e os ratos, animais muito utilizados na atualidade, pela semelhança do processo de carcinogênese com os seres humanos (WALLENIUS,¹²⁵ 1966; GIUNTA & SHKLAR³³, 1972; WALLENIUS & LEKHOLM¹²⁶⁻⁷, 1973; YAMAMURA et al.¹³⁶, 1975; WONG & WILSON¹³³, 1983; OHNE et al.⁸⁴, 1985; WILSON et al.¹³², 1995; KAPLAN et al.⁴⁷, 2001; RIBEIRO et al.⁹⁷, 2004; RIBEIRO⁹⁵, 2005; RIBEIRO et al.⁹⁶, 2005; VERED et al.¹²¹, 2005).

Com relação aos ratos, as tentativas iniciais para a indução de carcinomas também encontraram bastante dificuldade. Wallenius¹²⁵ (1966) mostrou que somente 30% dos ratos desenvolveram CE após o pincelamento de DMBA durante um período de 16 meses.

Porém, o desenvolvimento de uma metodologia confiável para a indução carcinomatosa em ratos foi estabelecido no trabalho de Wallenius & Lekholm¹²⁷ (1973), fazendo uso do carcinógeno 4NQO, que é hidrossolúvel, obtendo-se carcinomas experimentais em todos os ratos num período de sete meses. Setenta e cinco por cento dos animais

desenvolveram carcinomas no dorso da língua, e 20% na gengiva ou estômago (WALLENIIUS & LEKHOLM¹²⁶, 1973).

Yamamura et al.¹³⁶ (1975), na tentativa de prolongar a ação dos carcinógenos químicos, implantaram os mesmos em bolsa na mucosa de lábio de ratos criada cirurgicamente. Os carcinógenos utilizados foram o DMBA, o 20MC cristalino e o N-metil-n-nitrosoguanidina cristalino. Estes agentes induziram uma variedade de neoplasias incluindo: papilomas, carcinomas, neurofibromas, linfangiomas, hemangiomas e hemangiossarcomas, sendo assim um modelo de valor limitado para o estudo de CE.

Ribeiro et al.⁹⁷ (2004) utilizando teste do cometa no modelo de carcinogênese bucal em ratos, observaram que após quatro semanas de administração da 4NQO, já existiam danos primários no DNA na mucosa bucal aparentemente normal, e esses danos aumentavam de acordo com a gravidade das lesões histopatológicas observadas.

Ribeiro⁹⁵ (2005) utilizando ratos *Wistar* e 4NQO dissolvido na água como carcinógeno, concluiu que esta substância foi efetiva na carcinogênese, sendo padronizada neste modelo vinte semanas para o desenvolvimento de carcinoma, quando da utilização de solução aquosa a 50 ppm de 4NQO como água de beber.

O modelo de indução através da 4NQO em ratos possibilita a coleta de dados num aspecto temporal do processo de carcinogênese, possibilitando assim o desenvolvimento de estudos para o desenvolvimento de biomarcadores e agentes quimiopreventivos no estudo de carcinogênese bucal (KANOJIA & VAIDYA⁴⁶, 2006).

2.5 Apoptose

A multiplicação mitótica para o crescimento e renovação dos tecidos é um processo essencial nos organismos vivos. Porém, o processo de morte celular programada, ou apoptose, que é rápido e não deixa vestígios, também tem grande importância para as funções normais do organismo (THOMPSON¹¹⁷, 1995; CUMMINGS et al.²⁰, 1997).

A apoptose é um dos eventos celulares intimamente relacionados com os processos de desenvolvimento, resposta celular frente ao estresse, envelhecimento, e doenças nos eucariotos multicelulares, eliminando células que não possuem mais utilidade (ASHKENAZI & DIXIT¹⁰, 1998; ARAVIND et al.⁹, 2001; LORO et al.⁶⁴, 2003). Num ser humano adulto cerca de 50 a 70 bilhões de células entram em apoptose por dia (DELHALLE et al.²⁴, 2003).

A apoptose foi descrita pela primeira vez por Kerr et al.⁴⁹ (1972), e o seu aspecto morfológico é caracterizado pela condensação e fragmentação da cromatina (picnose), invaginação da membrana plasmática, retração da célula, com posterior fragmentação da mesma, resultando na formação de corpos apoptóticos os quais são fagocitados sem gerar resposta inflamatória, todo este processo se completa em 30 a 60 minutos (THORNBERRY & LAZEBNIK¹¹⁸, 1998, REED⁹³, 1999).

A descoberta de genes específicos da morte celular programada, que têm a função tanto de inibir, quanto promover a apoptose foi decifrado pela primeira vez no nematóide *Caenorhanditis elegans* (*C.elegans*) (ASHKENAZI & DIXIT¹⁰, 1998; DELHALLE et al.²⁴, 2003). Sendo no homem mais de 200 genes, ou cerca de 0,6% do genoma humano, relacionados com a regulação da apoptose (ARAVIND et al.⁹, 2001).

O controle da execução da apoptose envolve eventos moleculares em cascata que podem ser iniciados de diferentes maneiras, culminando na ativação das proteínas da família das cisteinilproteases, também chamadas de caspases – onde a letra “c”, refere se à protease cisteína, uma enzima com cisteína no sítio ativo, e “aspase”, à preferência por clivagem adjacente a resíduos aspartato (KUMAR et al.⁵⁵, 2005). Já foram descritas até o momento pelo menos 14 tipos de caspases, em células humanas e de camundongos, sendo que a ativação destas leva, direta ou indiretamente, a apoptose. Elas podem ser divididas funcionalmente em dois grupos: iniciadores e executores (KASIBHATLA & TSENG⁴⁸, 2003).

Existem duas vias principais de sinalização para iniciação da apoptose nas células dos mamíferos: a extrínseca, mediada por receptores de membrana celular, e a intrínseca, mediada pelos ativadores de apoptose mitocondriais (MALAGUARNERA⁶⁹, 2004).

Uma variedade de eventos chaves da apoptose estão focados na mitocôndria, incluindo a liberação de ativadores da caspase e as participações das proteínas pró e anti-apoptóticas, com exemplo a família Bcl-2 (GREEN & REED³⁶, 1998). A presença de sinais extracelulares para a morte podem ser reconhecida pelos receptores celulares de morte, e assim, ativar imediatamente o maquinário celular intrínseco da apoptose (ASHKENAZI & DIXIT¹⁰, 1998).

Disfunções nos mecanismos apoptóticos podem levar ao desenvolvimento de inúmeras doenças, as quais podem ser divididas em dois grandes grupos: aquelas doenças associadas com aumento de apoptose, e conseqüente excessiva morte celular, onde se enquadram as doenças neurodegenerativas, e aquelas associadas com apoptose deficiente, que permitem células anormais viáveis, dentre as quais se inserem as neoplasias malignas e as doenças auto-imunes (THOMPSON¹¹⁷, 1995; ASHKENAZI & DIXIT¹⁰, 1998).

Conforme os eventos descritos acima, a apoptose tem papel significativo como defensor do organismo no caso do desenvolvimento das neoplasias malignas. Uma vez que qualquer célula pode ativar seu programa de autodestruição quando acontecem modificações no seu conteúdo genético. Por estas razões, para acontecer o desenvolvimento da neoplasia maligna, a célula iniciada tem que vencer, entre outros obstáculos, os mecanismos apoptóticos (RAVI et al.⁹¹, 2001; YU & ZHANG¹³⁸, 2003).

Falhas na apoptose contribuem decisivamente para o processo de carcinogênese, criando um ambiente permissivo de instabilidade genética com acúmulo de mutações, promovendo maior resistência da célula contra o sistema imunológico, inibindo a realização dos pontos de checagem no ciclo celular que levariam a apoptose, reduzindo a dependência celular do oxigênio e nutrientes, facilitando a sobrevivência das células de maneira independente dos fatores de crescimento e hormônios, promovendo uma certa independência as células neoplásicas, e também conferindo resistência das neoplasias em relação a radiação e as drogas antineoplásicas citotóxicas. Haja vista que o tratamento com drogas quimioterápicas antineoplásicas tradicionais objetivam efeitos citotóxicos que podem culminar com os fenômenos relacionados à apoptose; por este motivo, células neoplásicas que possuem modificações no controle da apoptose, podem apresentar uma certa resistência a esta modalidade terapêutica (REED⁹²⁻³, 1997 e 1999; SCHOELCH et al.¹⁰³, 1999; SHANGARY & JOHNSON, 2003; MALAGUARNERA⁶⁹, 2004).

2.6 Survivina

A família das proteínas inibidoras de apoptose (IAP – do inglês *inhibitor of apoptosis protein*) é composta por proteínas com atividade antiapoptótica que se ligam e inibem as caspases 3, 7 e/ou 9, mas não 8. Existem evidências que as IAP modulam também a divisão celular, a progressão do ciclo celular e a via de transdução de sinais (SCHIMMER¹⁰², 2004). Estas proteínas foram descobertas inicialmente nas baculoviroses, nas quais estavam envolvidas na supressão da resposta de morte celular do hospedeiro contra a infecção viral (DEVERAUX & REED²⁵, 1999), e se caracterizam pela presença de uma ou até três cópias do domínio de aproximadamente setenta aminoácidos, chamado repetições IAP do baculovírus (BIR – do inglês *baculoviral IAP repeat*), que são essenciais para interação com as caspases, e assim exercerem funções antiapoptóticas (SCHIMMER¹⁰², 2004).

Dentre as proteínas IAP de classe 3, encontra-se a survivina, que contém um único domínio BIR (SCHIMMER¹⁰², 2004), sendo assim a menor das IAPs (LI & ALTIERI⁵⁸, 1999). A survivina é uma proteína com dupla função, inibe a apoptose e regula a divisão celular (AMBROSINI et al.⁶, 1997). Enquanto tecidos embrionários contém survivina em grandes quantidades, os tecidos maduros diferenciados não a possuem, com exceção do timo, células epiteliais da camada basal e células endoteliais (GROSSMAN et al.³⁷, 2001; REED⁹⁴, 2001; LO MUZIO et al.⁶², 2003; BOWEN et al.¹⁴, 2004; JOHNSON & HOWERTH⁴⁴, 2004; SCHIMMER¹⁰, 2004; ZAFFARONI et al.¹³⁹, 2005).

Survivina foi descoberta em 1997, quando se estava analisando a biblioteca do genoma humano através do uso de cDNA (DNA complementar) do EPR-1 (do inglês *effector cell protease receptor-1*) (AMBROSINI et al.⁶, 1997). O gene da survivina humana possui 15 kb, e está localizada no cromossomo 17, banda q25 (AMBROSINI et al.⁷,

1998; CHIOU et al.¹⁷, 2003). Este gene codifica a proteína survivina com 16,5 kD e 142 aminoácidos (VETTER et al.¹²², 2005; ZAFFARONI et al.¹³⁹, 2005). Já o gene da survivina de camundongos localiza-se na região telomérica do cromossomo 11, banda E2 (YAMAMOTO & TANIGAWA¹³⁵, 2001).

Apesar da maior parte das células mutadas serem inativadas no ponto de checagem entre as fases G1 e S, a survivina demonstra esta atividade entre as fases G2 e M (OMELYANCHUK, et al.⁸⁵, 2004). No início da mitose, a survivina associa-se aos microtúbulos do fuso mitótico, e a disfunção dessa interação resulta na perda da função anti-apoptótica da survivina, e aumento da atividade da caspase 3. O aumento da expressão da survivina no câncer pode transpor o ponto de checagem apoptótico entre as fases G2 e M, em favor da progressão das células transformadas durante a mitose (LI et al.⁵⁹, 1998).

Yang et al.¹³⁷ (2004) encontraram que a survivina pode ser essencial para a proliferação das células humanas normais, contribuindo para segregação das cromátides irmãs adequadas e formação e estabilização dos microtúbulos na mitose tardia. Entretanto, esta proteína não é essencial para a sobrevivência das células normais. No desenvolvimento dos neurônios do sistema nervoso central de camundongos, a presença de survivina é crítica para o desenvolvimento normal deste sistema sem que haja perda de neurônios, o que poderia comprometer as funções normais do sistema (JIANG et al.⁴³, 2005).

Grande parte dos estudos relacionados a survivina se dá principalmente nas neoplasias malignas, porém para um melhor entendimento das funções e mecanismos de ação desta proteína, o estudo em tecidos normais é de grande valia. A análise de camundongos em que o gene da survivina foi deletado das células tímicas, mostrou que a mesma não é essencial para a apoptose das células T, porém é crucial para a proliferação e maturação destas células, e assim ela é importante para a manutenção da homeostasia no processo de desenvolvimento das

células T (XING et al.¹²⁴, 1999). Num estudo também utilizando camundongos, foi observado que a survivina é importante na maturação das células precursoras dos eritrócitos e dos megacariócitos, porém tendo efeitos antagônicos nessas duas células, sendo que o aumento da expressão da survivina, antagonizou com o crescimento, maturação e poliploidização dos megacariócitos, e não teve efeito no desenvolvimento dos eritrócitos. Ao contrário, a redução da expressão da survivina, interferiu no desenvolvimento dos eritrócitos, mas não dos megacariócitos (GURBUXANI et al.³⁸, 2005).

Uma variedade de neoplasias malignas apresenta aumento da expressão da survivina, sugerindo a reativação deste gene nos cânceres. Atualmente a expressão da proteína survivina nas neoplasias está relacionada com um comportamento mais agressivo, diminuição da resposta ao tratamento rádio e quimioterápico, além de menor sobrevida quando comparados com os casos que não expressam esta proteína (AMBROSINI et al.⁷, 1998; ALTIERI⁵, 2001; REED⁹⁴, 2001; LO MUZIO et al.⁶², 2003; JOHNSON & HOWERTH⁴⁴, 2004; ZAFFARONI et al.¹³⁹, 2005; XIANG et al.¹²³, 2006). Segundo Mesri et al.⁷² (2001) e Blanc-Brude et al.¹¹ (2003) a atuação sobre a survivina em nível molecular pode resultar em atividades terapêuticas antineoplásicas em duas vias: induzindo a apoptose nas células neoplásicas e suprimindo a angiogênese.

Existem evidências que a survivina também tem um papel importante na angiogênese, evento muito importante na progressão das neoplasias malignas. O'Connor et al.⁸³ (2000) encontraram que a expressão gênica da survivina pode induzir crescimento das células endoteliais protegendo estas da apoptose durante a angiogênese. E ainda, a manipulação de moléculas antagonistas dessa via, é uma promissora fonte de estudo para a terapêutica do câncer.

Dentre as neoplasias que apresentam um aumento da expressão da survivina, já foi observado nos casos de linfomas não

Hodgkin de alto grau, carcinoma de células escamosas do pulmão, adenocarcinoma de pâncreas, cólon, mama e próstata, tanto pelas técnicas de imunistoquímica como pela hibridização *in situ*. Este aumento *per se* nas neoplasias pode não ser um marcador de transformação maligna, porém reflete uma resposta celular mais complexa (AMBROSINI et al.⁶, 1997). Dohi et al.²⁸ (2004) observaram que a survivina mitocondrial tem a propriedade de inibir a apoptose e assim, promover a carcinogênese. Encontram-se frações de survivina mitocondrial em várias neoplasias malignas, em oposição, não se observou nos tecidos normais.

Nos casos de carcinomas gástricos, a expressão de RNAm da survivina inicia-se em estágios iniciais da carcinogênese. E um aumento da expressão do RNAm desta proteína pode estar relacionado com um potencial de metástase para linfonodos em câncer gástrico (MIYACHI et al.⁷⁴, 2003).

No estudo da carcinogênese quimicamente induzida em pele de camundongos transgênicos com expressão cutânea da survivina, observou-se que apesar do paradoxal efeito negativo da survivina na indução carcinogênica, uma vez que nos animais transgênicos houve uma menor indução de CE quando comparados com animais normais; a expressão da survivina preveniu a regressão dos papilomas e promoveu a transformação desta para CE (ALLEN et al.⁴, 2003)

Diferenças na expressão da survivina entre os tecidos normais e neoplásicos pode dar direcionamentos importantes no campo da terapêutica em oncologia, principalmente com o avanço da terapia gênica. Além disso, a survivina pode ser utilizada como um marcador precoce das malignidades (SCHIMMER¹⁰², 2004), ou mesmo no caso de marcador diagnóstico para a presença de neoplasias ocultas, como nos estudos os quais encontraram-se níveis de survivina na urina significativamente maiores nos pacientes com carcinoma de bexiga, quando comparado com pacientes saudáveis (SMITH et al.¹⁰⁹, 2001;

SHARIAT et al.¹⁰⁶⁻⁷, 2004 e 2005). Entretanto, Davies et al.²² (2005) contestam a utilidade da survivina como um bom marcador na urina para o diagnóstico de carcinoma de bexiga, afirmando que este marcador tem um alto índice de falso-positivo na população sadia.

Nos CE que acometem as estruturas bucais, a survivina ainda tem sido pouco estudada. O estudo pioneiro utilizando survivina nos CE de boca foi conduzido por Lo Muzio et al.⁶¹ (2001), os quais estudaram a expressão da survivina em CE cutâneo e de boca, comparando com tecidos sem lesão. Eles observaram que os tecidos normais não expressaram este anticorpo, ao contrário dos casos de CE de pele (64% dos casos) e CE de boca (56% dos casos), e observaram que a positividade estava relacionada com neoplasias indiferenciadas, de tamanho maior que 1,5 cm e associação com metástases para linfonodos.

Autores do mesmo grupo do trabalho anterior, estudando agora as lesões cancerizáveis, observaram a expressão da survivina em 33% dos casos de lesões brancas que no acompanhamento não evoluíram para o CE. Já naquelas que se transformaram em CE, houve expressão em 94% dos casos. Assim eles concluíram que a expressão da survivina é um evento inicial durante a carcinogênese bucal, e assim pode ser usada como biomarcador para a identificação de lesões cancerizáveis com alto risco para progressão em direção ao CE (LO MUZIO et al.⁶², 2003).

Tanaka et al.¹¹⁵ (2003) investigaram a distribuição da survivina nos casos de CE e lesões cancerizáveis, observando 58% das neoplasias e 37% das lesões cancerizáveis foram positivas para a survivina, e nenhuma marcação foi observada nos tecidos normais correspondentes. Além disso, verificaram que a expressão gênica da survivina pode ser regulada por mecanismos epigenéticos, pois não foi observado metilação nos espécimes neoplásicos, ao contrário do tecido normal, nos quais foi observado metilação desse gene.

Lo Muzio et al.⁶³ (2005) estudaram 78 casos de CE, através da marcação imunoistoquímica da survivina, e concluíram que este marcador pode identificar os casos de CE com fenótipo mais agressivo e invasivo, podendo assim influenciar na decisão da terapia a ser instituída no momento do diagnóstico.

Kim et al.⁵¹ (2005) investigaram a expressão da survivina nos linfonodos cervicais como indicador prognóstico nos pacientes portadores do CE, encontraram que a marcação pela survivina nos linfonodos destes pacientes, estava relacionada com uma menor sobrevida do paciente. Além disso, a utilização da técnica molecular de identificação do RNAm da survivina, pode identificar micrometástases impossíveis de serem identificadas nos exames histopatológicos de rotina, direcionando assim para uma terapêutica mais adequada para cada caso.

Chen et al.¹⁶ (2005) estudaram a expressão da survivina na carcinogênese química induzida pelo DMBA em bolsa de bochecha de hamsteres. Encontraram imunorreatividade desta proteína e RNAm em todos os casos tratados com o DMBA, entretanto os casos não tratados ou naqueles onde houve a aplicação de óleo mineral, não se observou a marcação. Também foi observado neste estudo que os casos tratados com o DMBA não apresentaram metilação do gene survivina, ao contrário dos casos não tratados, ou tratados com óleo mineral. Eles concluíram assim que a survivina pode ter um importante papel nos carcinomas induzidos pelo DMBA em bolsa de bochecha, e a sua expressão gênica pode ser modulada por meio de mecanismos epigenéticos.

3 PROPOSIÇÃO

Embasados nos trabalhos vigentes na literatura, propomos avaliar, empregando a técnica imunoistoquímica com anticorpos anti-survivina, a correlação desta proteína relacionada a apoptose com diferentes fases da carcinogênese induzida pela 4NQO em mucosa de dorso lingual de ratos *Wistar*.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi realizado em parceria com o Núcleo de Avaliação Toxicogenética e Cancerígena (TOXICAN) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, utilizando-se do material embocado em parafina, resultante dos trabalhos prévios conduzidos por Ribeiro et al.⁹⁷ (2004) e Ribeiro et al.⁹⁶ (2005).

Todos os procedimentos realizados nos trabalhos supracitados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em reunião de 22 de novembro de 2002 (protocolo nº 252).

Os animais, ratos *Wistar* machos, foram distribuídos em quatro grupos de dez, três dos grupos qualificados como de estudo e um como de controle negativo, o qual teve o seu sacrifício realizado no período inicial, isto é, sem nenhum tratamento. Para os grupos estudo foi utilizado como carcinógeno a solução de 4NQO (Sigma, USA) 50 ppm, dissolvida na água para beber. Após quatro semanas do experimento procedeu-se o sacrifício dos animais do primeiro grupo de estudo, sacrifícios repetidos na 12^a semana com o segundo grupo, e na 20^a semana com o terceiro grupo.

Após o sacrifício, os espécimes tiveram as línguas recortadas em plano sagital mediano e fixadas em formalina tamponada a 10% por 24 horas para posterior processamento histológico. As lâminas com cortes semi-seriados de 5µm de espessura foram coradas com H.E. (hematoxilina e eosina) para análise histopatológica.

4.1 Análise histopatológica

A avaliação histopatológica, em cortes corados pelo método tintorial da H.E., foi realizada em microscopia de luz, aumento de 100 X, sendo considerados os seguintes diagnósticos: epitélio normal, hiperplasia, atipia epitelial e carcinoma. Os diagnósticos foram correlacionados com os respectivos tempos de exposição ao carcinógeno.

4.2 Imunoistoquímica

O estudo imunoistoquímico seguiu a seguinte metodologia:

- a) os blocos cortados em espessuras de 4 μ m foram desparafinizados em xilol e reidratados em série descendente de etanóis, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95%, 85% e 80%, durante 5 minutos cada;
- b) após lavagem em água corrente e água destilada, as lâminas receberam os tratamentos de recuperação antigênica por meio de solução tampão citrato a 0,01M (pH = 6), em três ciclos de 5 minutos cada em forno de microondas (850 W). A cada ciclo foi completada a solução tampão, de modo que as lâminas ficassem sempre cobertas pela solução. Estes procedimentos visaram restabelecer os sítios antigênicos e romper as ligações cruzadas com o formol;

- c) após os 15 minutos, as lâminas foram deixadas no forno desligado durante 20 minutos. Depois, transferidas das cubas para as bandejas;
- d) o material foi posteriormente pré-incubado numa solução de 0,3% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em PBS (solução tampão fosfato) durante 5 minutos para inativação da peroxidase endógena e, após, bloqueada com solução de albumina sérica à 5% em PBS durante 10 minutos;
- e) após isto, foi pingado PBS, seu excesso removido com bomba a vácuo e, em seguida, pingou-se os anticorpos anti-survivina (clone A-19), concentração 1:50 (Santa Cruz Biotechnology, California, USA) ;
- f) as bandejas foram vedadas com fita adesiva e colocadas na geladeira por uma noite à 4° C;
- g) após este período, as lâminas foram lavadas em PBS, e, em seguida, tratadas com anticorpos secundários biotinilados tipo IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA);
- h) após os primeiros 30 minutos, foram preparadas as soluções de ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) – (cálculo para quarenta lâminas), que seguiu o próximo passo;
 - 5mL de PBS;
 - avidina: uma gota;
 - biotina: uma gota.

Foi agitado e deixado descansar durante 30 minutos.

As lâminas foram lavadas com PBS, e em seguida, pingada a solução de ABC (já preparada) deixando durante 45 minutos.

Quando faltavam 5 minutos para findar o tempo do ABC, era preparada a DAB (diaminobenzidina) – (cálculo para quarenta lâminas), seguindo:

- 10mL de Trizma para DAB;
- 10mg de DAB;
- 0,2mL de H₂O₂ (0,1mL de H₂O₂ 30 volumes e 0,9 mL de PBS).

Deixando o Trizma, o H₂O₂ e a DAB em tubos de ensaio separados; a mistura foi realizada na hora do uso, na seguinte ordem:

- colocar o Trizma na DAB e misturar com ponteira;
 - colocar o H₂O₂ e misturar com ponteira.
- i) as lâminas foram lavadas com PBS, removido o excesso, pingou-se a DAB deixando agir por 5 minutos;
 - j) após esta etapa as lâminas foram lavadas em água corrente, escorrido o excesso, pingou-se sobre os cortes a Hematoxilina de Harris, contra-corante, durante um minuto. Foram lavados em água corrente novamente, seguidos por banho de água amoniacal, antes da desidratação;
 - k) as lâminas foram retiradas da bandeja e colocadas em berços para desidratação (cinco cubas de álcool absoluto e três cubas de xilol) e foram montadas com resina sintética (Permount);
 - l) Para o controle negativo da reação, algumas lâminas foram processadas do mesmo modo como descrito, porém se omitindo o anticorpo primário.

4.3 Análise imunoistoquímica

A avaliação imunoistoquímica das lâminas marcadas pelos anticorpos anti-survivina foi realizada em microscópio óptico comum, em aumento de 400 X, por três examinadores, D.A. R., M.E.A.M. e D.K.. Sendo realizada análise qualitativa do material, isto é, positividade ou não da marcação e sua respectiva localização no epitélio, correlacionando-se com o tempo de exposição a 4NQO, e com o diagnóstico histopatológico.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histopatológica

A análise histopatológica das lesões foi realizada por dois patologistas especialistas (D.A.R. e M.E.A.M.) com o acompanhamento do aluno de doutorado (D.K.), sendo baseado nas instruções de Fassoni³¹ (1993), como segue: mucosa normal; hiperplasia, atipia epitelial e carcinoma. Os aspectos microscópicos do grupo controle apresentavam-se com um epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado (mucosa bucal do tipo especializada) em contato com a lâmina própria formada por tecido conjuntivo frouxo pouco celularizado. Nos planos profundos, observaram-se tecido muscular estriado esquelético, células adiposas, bem como ácinos e ductos de glândulas salivares menores linguais serosas e mucosas na porção mais posterior (FIGURA 1). Estes relatos correspondem ao aspecto de normalidade. No grupo experimental tratado com a 4NQO, as alterações histopatológicas puderam ser evidenciadas somente a partir de 12 semanas. Tais alterações foram descritas como hiperplasia e hiperqueratose com ou sem atipia. Em vinte semanas, o grau de severidade de atipia aumentou, sendo que a maioria dos casos de atipia mostrou atipia severa. Carcinomas microinvasivo e invasivo puderam ser observados neste período. Os carcinomas 4NQO-induzidos, em geral, são bem diferenciados, pois, apesar da atipia celular traduzida pelo pleomorfismo e hiperchromatismo exuberantes e pelas mitoses freqüentes, são abundantes a disqueratose e as pérolas córneas. A organização tecidual, a relação intercelular e o modelo de invasividade são condizentes com uma diferenciação celular ainda presente. Os padrões morfológicos bem diferenciados dos carcinomas 4NQO-induzidos provavelmente explicam o baixo índice de metástases encontrado neste

modelo experimental. A histopatologia da evolução da carcinogênese lingual murina está apresentada na FIGURA 2. Também permite inferir que as lesões detectáveis do ponto de vista macroscópico ou clínico são correlatas aos achados microscópicos. Os resultados das lesões histopatológicas obtidas nos espécimes estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Incidência dos quadros histopatológicos do modelo de carcinogênese bucal induzidos pela (4NQO)^a, em mucosa de língua de ratos⁹⁶

Grupos (semanas)	Nº de animais	Diagnósticos histopatológicos			
		Normal	Hiperplasia	Atipia	Carcinoma
0 (Controle)	10	10	0	0	0
4	10	10	0	0	0
12	10	0	7	3	0
20	10	0	0	3	7

^a4NQO – 50 ppm na água de beber

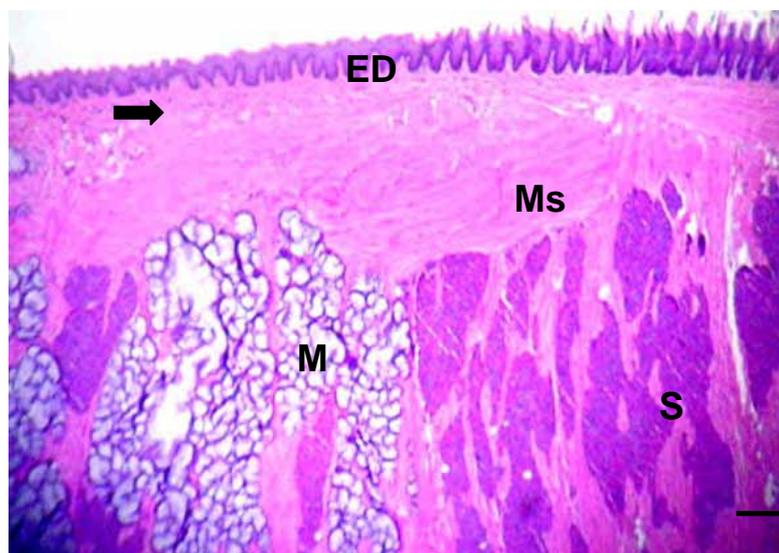


FIGURA 1 – Fotomicrografia mostrando mucosa bucal normal da região posterior da língua do grupo controle. Note o epitélio dorsal (ED), lâmina própria (seta), músculo (Ms) e abaixo glândulas mucosas (M) e serosas (S). Barra = 110µm

5.2 Análise imunoistoquímica

Os resultados da análise imunoistoquímica para o anticorpo anti-survivina obtidas nos espécimes estão descritos na Tabela 2 e podem ser visualizados na FIGURA 3. Realizou-se análise qualitativa do material, isto é, observou-se imunorreatividade ou não do material. Toda marcação da survivina deu-se de maneira fraca, sendo predominantemente citoplasmática, e o epitélio não tratado com a 4NQO, não apresentou em momento algum do estudo, positividade na reação – grupo controle: negativo para a expressão da survivina.

Á partir de 4 semanas de tratamento com a 4NQO, verificou-se expressão da survivina citoplasmática na região de camada granulosa e córnea do epitélio tratado em sete dos dez animais. Após 12 semanas de administração da 4NQO, houve marcação na camada córnea

dos espécimes de dois animais classificados histopatologicamente como hiperplasia, e três, classificados como atipia.

Os casos de CE foram observados após vinte semanas de tratamento com a 4NQO. Nestes, observou-se expressão da survivina em cinco dos sete animais, nas proximidades das regiões queratinizadas, tanto em região superficial, quanto em regiões próximas as pérolas córneas. Ainda nos animais deste grupo, observou-se positividade da survivina em todos animais classificados histopatologicamente como atipia.

Tabela 2 – Número de casos com expressão da survivina de acordo com o quadro histopatológico, seguindo a administração da 4NQO na dose de 50 ppm

Grupos (semanas)	Alterações no epitélio¹				Total
	Normal	Hiperplasia	Atipia	Carcinoma	
Controle (zero)	0	0	0	0	00
4	7	0	0	0	07
12	0	2	3	0	05
20	0	0	3	5	08

¹Valores são expressos por animal.

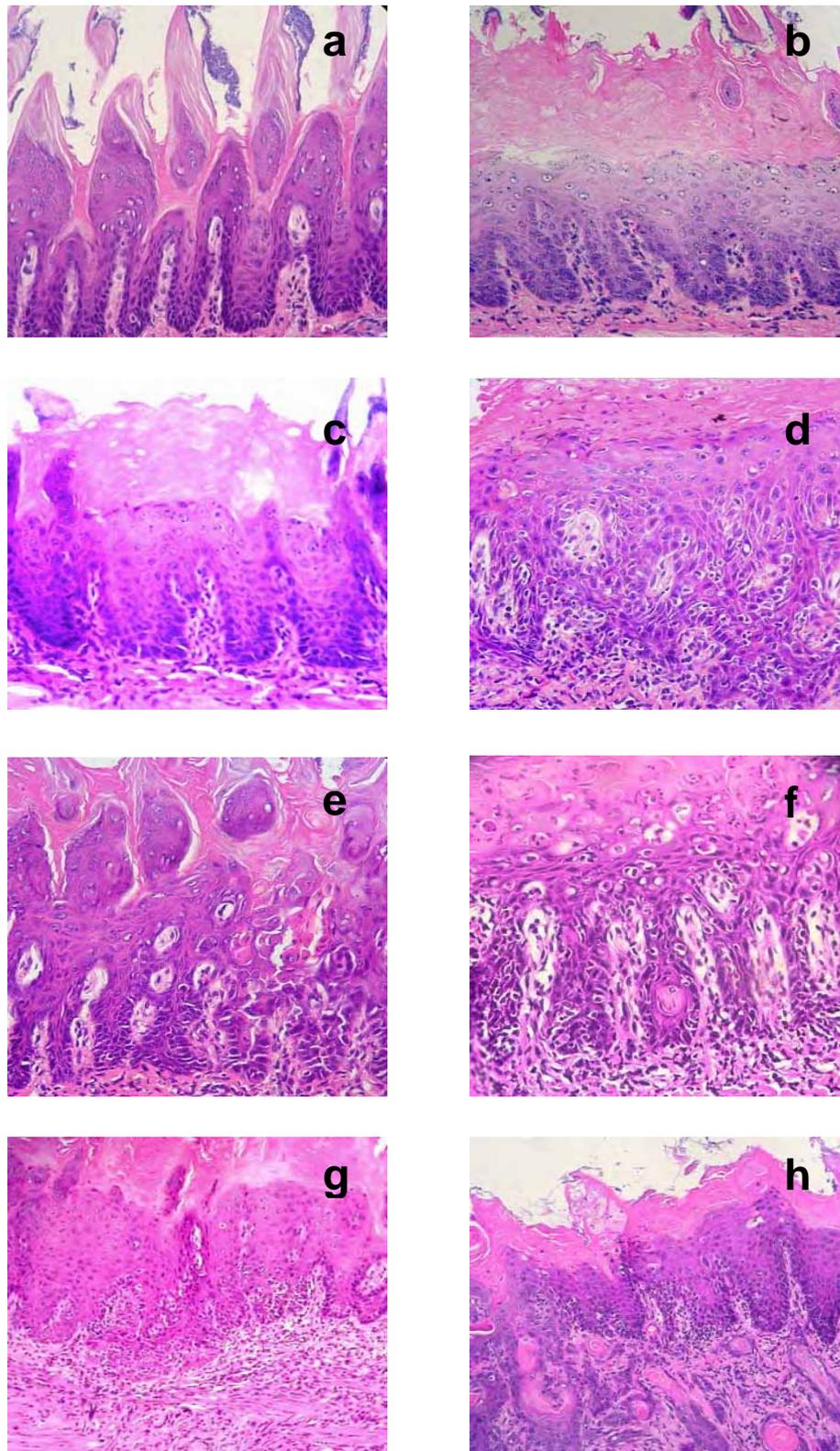


FIGURA 2 – Análise histopatológica durante a evolução da carcinogênese (H.E.): a) mucosa lingual do dorso da língua normal; b) hiperplasia e hiperqueratose sem atipia; c) hiperplasia e hiperqueratose com atipia discreta; d) hiperplasia e hiperqueratose com atipia moderada; e) hiperplasia e hiperqueratose com atipia grave; f) carcinoma *in situ*; g) carcinoma epidermóide microinvasivo; h) carcinoma epidermóide bem diferenciado.

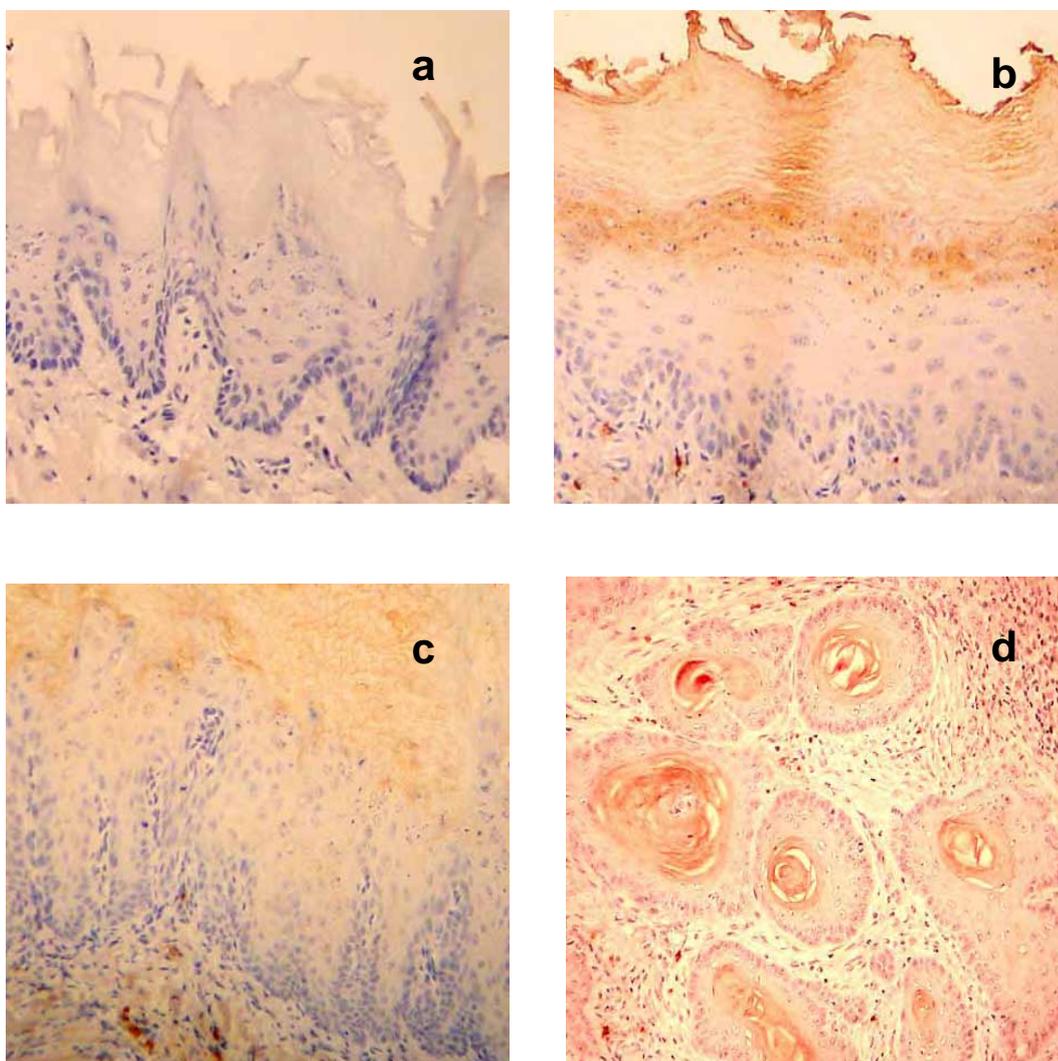


FIGURA 3 – Análise imunoistoquímica durante a evolução da carcinogênese (survivina) X 400. (a) controle negativo com ausência de marcação. (b) 4 semanas pós-tratamento com a 4NQO, demonstrando marcação citoplasmática nas camadas superficiais do epitélio. (c) 12 semanas de tratamento com a 4NQO, demonstrando marcação nas camadas superficiais do epitélio de uma lesão classificada histopatologicamente como hiperplasia com atipia. (d) 20 semanas de tratamento com a 4NQO, demonstrando marcação em áreas de disqueratose numa lesão classificada como carcinoma epidermóide bem diferenciado.

6 DISCUSSÃO

Atualmente o objetivo principal na área de saúde é a prevenção da doença. Quando a prevenção não é mais possível e resta somente o tratamento como última opção, o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico e aplicações terapêuticas, podem ser testadas e estudadas em animais de laboratório (MOGNETTI et al.⁷⁵, 2006).

Vários fatores influenciam nos ensaios de carcinogênese de média duração, como espécie animal, tipo de carcinógeno aplicado, tempo de administração, escolha do solvente, sítio de aplicação da droga, frequência e modo de aplicação, além da execução ou não de trauma prévio na região (KOLAS⁵³, 1955; KRESHOVER & SALLEY⁵⁴, 1957; EVESON³⁰, 1981). Tem-se também aqueles inerentes a cada animal, como fator genético predisponente, idade do animal, fatores nutricionais e distúrbios das funções endócrinas (EVESON³⁰, 1981; KITAKAWA⁵², 2003; RIBEIRO⁹⁵, 2005).

Particularmente, a região intrabucal dos animais possui vários obstáculos para os ensaios de carcinogênese quimicamente induzida. Dentre estes, vários fatores foram relacionados, como o efeito protetor que a saliva exerce sobre os tecidos bucais (KOLAS⁵³, 1955; GOLDHABER³⁴, 1957; FUJITA et al.³², 1973; WALLENIUS & LEKHOLM¹²⁶⁻⁷, 1973; DAYAN et al.²³, 1997; KAPLAN et al.⁴⁷, 2001); a ação mecânica da língua interrompendo ou diminuindo a ação do carcinógeno na mucosa bucal (KRESHOVER & SALLEY⁵⁴, 1957); e em particular a falta de uma via de entrada natural, como os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas, que favorecem a penetração dos carcinógenos (SALLEY¹⁰⁰, 1954; GOLDHABER³⁴, 1957; LEVY⁵⁷, 1958).

Várias espécies animais têm sido utilizadas para o estudo da carcinogênese intrabucal, porém, os mais utilizados são hamsteres e

ratos, observando-se diferenças importantes na metodologia de indução carcinogênica e no carcinógeno utilizado.

Salley¹⁰⁰ (1954) foi o pioneiro na obtenção de 100% de sucesso na indução de CE em região de bolsa jugal de hamsteres. Posteriormente, Fujita et al.³² (1973) desenvolveram um modelo de carcinogênese química em bordo lingual de hamsteres, que passou a ser amplamente utilizado por outros pesquisadores (MAREFAT & SHKLAR⁷¹, 1977; EVESON³⁰, 1981; MAREFAT⁷⁰, 1985; KITAKAWA⁵², 2003; MAGALHÃES⁶⁸, 2004; MONTEIRO⁷⁶, 2004). Apesar do DMBA ser o carcinógeno de escolha no tratamento de hamsteres, uma grande gama de substâncias já foi utilizada, como o alcatrão de carvão, 3, 4BP, 20MC e 4NQO (SALLEY¹⁰⁰⁻¹, 1954 e 1957; KOLAS⁵³, 1955; GOLDHABER³⁴, 1957; KRESHOVER & SALLEY⁵⁴, 1957; LEVY⁵⁷, 1958; MORRIS⁷⁸, 1961; AL-ANI & SHKLAR², 1966; DACHI²¹, 1967; GIUNTA & SHKLAR³³, 1972; FUJITA et al.³², 1973; MAREFAT & SHKLAR⁷¹, 1977; EVESON³⁰, 1981; MAREFAT⁷⁰, 1985; FASSONI et al.³¹, 1993; COLON et al.¹⁹, 1999; SCHWARTZ et al.¹⁰⁴, 2000; KAPLAN et al.⁴⁷, 2001; KITAKAWA⁵², 2003; MAGALHÃES⁶⁸, 2004; MONTEIRO⁷⁶, 2004).

Com relação aos ratos, obtiveram-se melhores resultados, principalmente após o trabalho de Wallenius & Lekholm¹²⁶⁻⁷ (1973), que induziram carcinomas em todos os animais na região de palato, utilizando o carcinógeno 4NQO, após um período de aplicação de sete meses. Assim nos ratos, o carcinógeno escolhido tem sido a 4NQO (YAMAMURA et al.¹³⁶, 1975; WONG & WILSON¹³³, 1983; STEIDLER & READE¹¹¹⁻², 1984 e 1986; OHNE et al.⁸⁴, 1985; WILSON et al.¹³², 1995; RAMOTAR et al.⁹⁰, 1998; KAPLAN et al.⁴⁷, 2001; VERED et al.¹²¹, 2004; RIBEIRO et al.⁹⁷, 2004, RIBEIRO⁹⁵, 2005; RIBEIRO et al.⁹⁶, 2005).

Os ensaios de carcinogênese quimicamente induzida em ratos ou hamsteres possibilitam um estudo fase por fase de todo o processo de transformação maligna. Dessa forma é possível a utilização de marcadores biológicos para um entendimento cada vez maior desse

processo. Além disso, neste tipo de estudo também é possível a utilização de substâncias e verificação de suas respectivas atividades quimiopreventivas (KANOJIA & VAIDYA⁴⁰, 2006).

Neste estudo, utilizaram-se os ratos, uma vez que existem semelhanças anatômicas com os humanos, assim como, são de fácil manipulação em biotério. Além disso, o processo de carcinogênese bucal é mais simples quando comparado com a metodologia aplicada em hamsteres (RIBEIRO⁹⁵, 2005), uma vez que a 4NQO é dissolvida na água de beber dos animais, não sendo necessária a aplicação do carcinógeno individualmente em cada animal. Para o experimento clássico em hamsteres (SALLEY et al.¹⁰⁰, 1954) são necessárias pelo menos 48 etapas manipulando cada animal até a indução carcinogênica, sendo, portanto, mais trabalhoso e com maior risco no que tange a biossegurança (MOGNETTI et al.⁷⁵, 2006).

As linhagens animais podem ser divididas em isogênicas e não isogênicas. Escolheu-se para este estudo os animais não-isogênicos, que são geneticamente heterogêneos, já que alguns autores verificaram que as linhagens geneticamente idênticas, possuem menor validade, uma vez que não demonstra a variabilidade genética que existe entre a nossa população (ABRAMOVICI & WOLMAN¹, 1987; MOGNETTI et al.⁷⁵, 2006).

Neste estudo as regiões acometidas pelo CE intrabucal foram o palato e a mucosa de dorso de língua. A mucosa de língua é uma das regiões mais acometidas pelo CE no ser humano (NEVILLE et al.⁸⁰, 1998; PINTO & CAVALLARI⁸⁷, 2002), por isso preferiu-se utilizar esta região topográfica a despeito da região de palato.

De uma maneira geral, em nosso experimento pode-se observar que a administração crônica da 4NQO induziu lesões brancas detectáveis macroscopicamente na maior parte dos espécimes expostos, visto que estes achados concordam com outros estudos (OHNE et al.⁸⁴, 1985; NISHIMURA⁸¹, 1999; NIWA et al.⁸², 2001). Tais lesões

assemelham-se a leucoplasias em seres humanos, principais lesões cancerizáveis na mucosa bucal clinicamente detectáveis na prática estomatológica (NEVILLE et al.⁸⁰, 1998).

Já os CE 4NQO-induzidos, em geral, são bem diferenciados, pois, apesar da observação de atipia celular traduzida pelo pleomorfismo e hiperchromatismo exuberantes e pelas mitoses freqüentes, são abundantes a disqueratose e as pérolas córneas. A organização tecidual, a relação intercelular e o modelo de invasividade são condizentes com uma diferenciação celular ainda presente. Esses achados corroboram com a literatura (NISHIMURA⁸¹, 1999). Os padrões morfológicos bem diferenciados dos carcinomas 4NQO-induzidos provavelmente explicam o baixo índice de metástases encontrado neste modelo experimental (OHNE et al.⁸⁴, 1985). A histopatologia da evolução da carcinogênese lingual murina está apresentada na FIGURA 2. Nossos achados estão em consonância com a maioria dos autores que fizeram uso deste modelo em ratos (NISHIMURA⁸¹, 1999; NIWA et al.⁸², 2001; RIBEIRO et al.⁹⁷, 2004). Também permite inferir que as lesões detectáveis do ponto de vista macroscópico ou clínico são correlatas aos achados microscópicos. Os resultados das lesões histopatológicas obtidas nos espécimes estão descritos na Tabela 1.

Neste estudo optou-se pela utilização da técnica da imunistoquímica para a survivina, que apresenta a grande vantagem de ser relativamente simples, e não requerer aparatos sofisticados, como os utilizados em biologia molecular.

A survivina faz parte da família das IAP, família de proteínas capazes de bloquear a apoptose. Ela tem sido encontrada em malignidades hematológicas e sólidas, sendo sua expressividade ausente na maioria dos tecidos adultos diferenciados (AMBROSINI et al.⁶, 1997; JOHNSON & HOWERTH⁴⁴, 2004). Desde a sua descoberta em 1997 (AMBROSINI et al.⁶, 1997), tem-se sugerido que esta proteína é um importante marcador neoplásico, e também um indicador prognóstico e de

terapia no câncer. (YAMAMOTO & TANIGAWA¹³⁵, 2001). O bloqueio da apoptose parece ser um evento importante na transformação maligna das células da mucosa bucal de ratos, como demonstrado por alguns autores (NISHIMURA⁸¹, 1999; RIBEIRO et al.⁹⁶, 2005).

Por esta razão, aliado à escassez de estudos utilizando-se deste biomarcador na carcinogênese bucal, decidimos estudar a expressão da survivina na carcinogênese quimicamente induzida pela 4NQO em mucosa bucal de ratos *Wistar*.

No grupo controle negativo, nenhuma expressividade foi evidenciada na mucosa lingual, assim como em estudos anteriores (AMBROSINI et al.⁶, 1997; CHEN et al.¹⁶, 2005). Em tecidos adultos, geralmente só existe a expressão da survivina em determinados tipos celulares, como células do timo e células endoteliais, isto é, células com potencial mitogênico, diferente dos tecidos embrionários em que a maioria desses expressa a survivina (AMBROSINI et al.⁶, 1997; GROSSMAN et al.³⁷, 2001; REED⁹⁴, 2001; LO MUZIO et al.⁶², 2003; JOHNSON & HOWERTH⁴⁴, 2004; SCHIMMER¹⁰², 2004; YANG et al.¹³⁷, 2004; ZAFFARONI et al.¹³⁹, 2005). Acredita-se que a survivina seja importante no período de reprodução das células, porém ela não é essencial para a sobrevivência celular (YANG et al.¹³⁷, 2004). A análise de camundongos em que o gene da survivina foi deletado das células tímicas, mostrou que a mesma é crucial para a proliferação bem como para a maturação, sendo importante para a manutenção da homeostasia no processo de desenvolvimento das células T (XING et al.¹²⁴, 2004).

Após quatro semanas de administração da 4NQO, nas camadas granulosa e córnea do epitélio, encontrou-se a expressão da survivina nos casos sem quaisquer alterações, tanto em nível macro, como microscópico. Tais resultados sugerem a importância da atividade desta proteína perante a apoptose nos períodos iniciais da carcinogênese de mucosa bucal de ratos *Wistar*, sugerindo-se assim um bloqueio do maquinário celular apoptótico nos períodos iniciais do estudo, o que

favoreceria o acúmulo de mutações, contribuindo para carcinogênese (ALTIERI⁵, 2001; ZAFFARONI et al.¹³⁹, 2005). Baseado nestes achados, parece evidente que a expressão da survivina está associada com um aumento no risco para o desenvolvimento do CE induzido pela 4NQO em mucosa bucal de ratos.

Estudos conduzidos por Tanaka et al.¹¹⁵. (2003) e Chen et al.¹⁶ (2005), demonstraram que esse gene estava hipometilado nos casos de CE, sugerindo assim que a expressão gênica da survivina é regulada por mecanismos epigenéticos. Estes fatores decorrem de alterações na expressão do gene, sem que haja mutação. A hipometilação do gene da survivina promoveria a sua ativação, havendo, portanto, inibição da apoptose, e favorecimento do acúmulo de mutações e o desenvolvimento da carcinogênese. Tais estudos foram realizados em hamsteres, região de bolsa de bochecha (CHEN et al.¹⁶, 2005) e em espécimes de humanos (TANAKA et al.¹¹⁵, 2003).

Foi possível também observar a expressão da survivina nos casos classificados histopatologicamente como hiperplasia, mesmo sem a presença de atipias. Embora a survivina não esteja diretamente relacionada com a proliferação celular, ela poderia estar contribuindo indiretamente para o aumento de células epiteliais através do bloqueio da apoptose.

Nos casos classificados como atipia, observou-se a marcação nas camadas superficiais do epitélio em todos os casos (seis dos seis casos classificados como atipia), e nos casos de CE bem diferenciados, após vinte semanas de estudo, observou-se marcação em cinco dos sete casos classificados como carcinoma, nas células próximas as regiões queratinizadas. Nossos achados corroboram com os resultados encontrados nas neoplasias de outras localidades, como o carcinoma nasofaringeano (XIANG et al.¹²³, 2006), adenocarcinoma pancreático (AMBROSINI et al.⁶, 1997; LEE et al.⁵⁶, 2005), linfomas não Hodgkin de alto grau, carcinoma de células escamosas de pulmão,

adenocarcinoma de mama, colorretal e próstata (AMBROSINI et al.⁶, 1997; KIM et al.⁵⁰, 2003; IDENOUE et al.⁴¹, 2005), câncer gástrico (MIYACHI et al.⁷⁴, 2003), CE experimental cutâneo (ALLEN et al.⁴, 2003), também nos CE das estruturas de revestimento bucal (LO MUZIO et al.⁶¹⁻³, 2001, 2003 e 2005; TANAKA et al.¹¹⁵, 2003), e nos casos de metástases linfonodais do CE de boca (KIM et al.⁵¹, 2005). É importante frisar que todos os casos de CE foram classificados como bem diferenciados, característica deste modelo de carcinogênese, e a expressão da survivina se deu justamente nas proximidades das áreas queratinizadas.

A expressão da survivina principalmente nos períodos iniciais e intermediários deste experimento permite incluí-la como ferramenta adicional no diagnóstico de alterações presentes na mucosa bucal de ratos. Entretanto, novos estudos na área são interessantes para validar esse biomarcador na carcinogênese bucal, pois abrirão horizontes para a localização de lesões cancerizáveis na mucosa bucal com real potencial de malignização, proporcionando, assim, uma objetividade maior no tratamento, além de estar prevenindo o desenvolvimento do CE.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos da análise histológica e imunoistoquímica, pôde-se concluir que:

- a) a survivina participa da fase inicial do processo de carcinogênese quimicamente induzida pela 4NQO em mucosa lingual de ratos Wistar;
- b) a inibição da apoptose mostrou-se um evento precoce na carcinogênese induzida pela 4NQO, observando-se a expressão da survivina a partir da quarta semana do experimento, estando o epitélio dentro dos padrões histológicos da normalidade;
- c) a survivina expressou-se nos casos classificados histopatologicamente como normais, com hiperplasia epitelial, com atipias celulares e nos carcinomas epidermóides induzidos pela 4NQO em mucosa de dorso de língua de ratos Wistar, e;
- d) a técnica de imunoistoquímica da survivina mostrou-se como biomarcador para a detecção precoce de alterações celulares relacionadas com o desenvolvimento de carcinoma quimicamente induzido em língua de rato.

5 REFERÊNCIAS *

- 1 ABRAMOVICI, A.; WOLMAN, M. Inbred strains of laboratory animals: superior to outbred mice? **J Natl Cancer Inst**, v.87, p.933, 1987.
- 2 AL-ANI, S.; SHKLAR, G. Effects of a chemical carcinogen applied to hamster gingiva. **J Periodontol**, v.37, p.36-42, 1966.
- 3 ALBERTS, B et al. **Molecular biology of cell**. 3.ed. New York: Garland, 1994. 1294 p.
- 4 ALLEN, S.M. et al. Survivin expression in mouse skin prevents papilloma regression and promotes chemical-induced tumor progression. **Cancer Res**, v.63, p.567-72, Feb.2003.
- 5 ALTIERI, D.C. The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. **Trends Mol Med**, v.7, n.12, p.542-7, Dec.2001.
- 6 AMBROSINI, G.; ADIDA, C.; ALTIERI, D.C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in câncer and lymphoma. **Nat Med**, v.3, n.8p.917-21, Aug.1997.

* Baseado em:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Rio de Janeiro. **Informação e documentação**: referências, elaboração, NB6023. Rio de Janeiro, 2002. 23p.

- 7 AMBROSINI, G. et al. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. **J Biol Chem**, v.273, n.18, p.11177-82, May.1998.
- 8 AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY American society of clinical oncology policy statement update: tobacco control – reducing cancer incidence and saving lives. **J Clin Oncol**, v.21, n.14, p.2777-86, 2003.
- 9 ARAVIND, L.; DIXIT, V.M.; KOONIN, E.V. Apoptotic molecular machinery: vastly increased complexity in vertebrates revealed by genome comparisons. **Science**, v.291, p.1279-84, Feb.2001.
- 10 ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, v.281, n.5381, p.1305, Aug.1998.
- 11 BLANC-BRUDE, O.P. et al. Therapeutic targeting of the survivin pathway in cancer: initiation of mitochondrial apoptosis and supression of tumor-associated angiogenesis. **Clin Cancer Res**, v.9, p.2683-92, Jul.2003.
- 12 BOSH, F.X. et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol**, v.55, p.244-65, 2002.
- 13 BOSSO, R.M.V.; FROES, N.D.T. Origem das mutações. In: LOURO, I.D. et al. **Genética molecular do câncer**. 2.ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002. Cap. 2, p.25-30.

- 14 BOWEN, A.R. et al. Proliferation, apoptosis, and survivin expression in keratinocytic neoplasms and hyperplasias. **Am J Dermatopathol**, v.26, n.3, p.177-81, Jun.2004.
- 15 BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas – 2005**. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <[http://www.inca.gov.Br/estimativa/2006/versão final.pdf](http://www.inca.gov.Br/estimativa/2006/versão_final.pdf) >. Acesso em: 05mar.2006.
- 16 CHEN, Y.K.; HSUE, S.S.; LIN, L.M. Survivin expression is regulated by an epigenetic mechanism for DMBA-induced hamster buccal-pouch carcinomas. **Arch Oral Biol**, v.50, p.593-8, 2005.
- 17 CHIOU, S.K.; JONES, M.K.; TARNAWSKI, A.S. Survivin – an anti-apoptosis protein: its biological roles and implications for cancer and beyond. **Med Sci Monit**, v.9, n.4, p.143-47, 2003.
- 18 CLOOS, J. et al. Mutagen sensitivity: enhanced risk assessment of squamous cell carcinoma. **Oral Oncol, Eur J Cancer**, v.32B, n.6, p.367-72, 1996.
- 19 COLON, V.JM. et al. Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. **Carcinogenesis**, v.20, n.10, p.1885-91, 1999.
- 20 CUMMINGS, M.C.; WINTERFORD, C.M.; WALKER, N.I. Apoptosis. **Am J Surg Pathol**, v.21, n.1, p.88-101, 1997.

- 21 DACHI, S.F. Experimental production of carcinomas of the hamster tongue. **J Dent Res**, v.46, n.6, p.46, 1967.
- 22 DAVIES, B. et al. Contribution of prostate limits of usefulness of survivin for the detection of bladder cancer. **J Urol**, v.174, p.1767-70, 2005.
- 23 DAYAN, D. et al. Experimental tongue cancer in desalivated rats. **Oral Oncol**, v.33, n.2, p.105-9, 1997.
- 24 DELHALLE, S. et al. An introduction to the molecular mechanisms of apoptosis. **Ann N Y Acad Sci**, v.1010. p.1-8, 2003.
- 25 DEVERAUX, Q.L.; REED, J.C. IAP family proteins – supressors of apoptosis. **Genes & Dev**, v.13, p.239-52, 1999.
- 26 DIGIOVANNI, J. Multistage skin carcinogenesis in mice. In: WAALKES, M.P.; WARD, J.M. **Carcinogenesis**. New York: Raven Press, 1994. Cap. 9, p.265-99.
- 27 DÖBROSSY, L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Rev**, v.24, p.9-17, 2005.
- 28 DOHI, T. et al. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. **J Clin Invest**, v.114, n.8, p.1117-27, Oct.2004.
- 29 EVAN, G.; LITTLEWOOD, T. A matter of life and cell death. **Science**, v.281, p.1317 (6), Aug.2001.

- 30 EVESON, J.W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. **J Oral Pathol**, v.10, n.3, p.129-46, 1981.
- 31 FASSONI, A.A.; SALLES, C.L.F.; CONSOLARO, A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: estudo em hamsters sírios dourados. **Pesq Odontol Bras**, v.7, p.285-91, 1993.
- 32 FUJITA, K. et al. Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9, 10-Dimethyl-1, 2-Benzanthracene. **J Dent Res**, v.52, n.2, p.327-32, Mar./Apr. 1973.
- 33 GIUNTA, J.; SHKLAR, G. Studies on tongue carcinogenesis in rats using DMBA with and without cyanoacrylate adhesive. **Archs Oral Biol**, v.17, p.617-22, Mar.1972.
- 34 GOLDHABER, P. The role of saliva and other local environmental factors in oral carcinogenesis. **J Am Dent Assoc**, v.54, p.517-24, Apr.1957.
- 35 GOODGER, N. et al. Cell cycle regulatory proteins – an overview with relevance to oral cancer. **Oral Oncol**, v.33, n.2, p.61-73, Mar. 1997.
- 36 GREEN, D.R.; REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v.281, n.5381, p.1309, Aug.1998.

- 37 GROSSMAN, D. et al. Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. **J Clin Invest**, v.108, p.991-99, 2001.
- 38 GURBUXANI, S. et al. Differential requirements for survivin in hematopoietic cell development. **PNAS**, v.102, n.32, p.11480-5, Aug. 2005.
- 39 HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, p.57-70, Jan.2000.
- 40 HARTWELL, L.H.; KASTAN, M.B. Cell cycle control and cancer. **Science**, v.266, n.5192, p.1821-8, Dec. 16, 1994.
- 41 IDENOUE, S. et al. A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. **Clin Cancer Res**, v.11, p.1474-82, 2005.
- 42 JEFFERIES, S.; FOULKES, W.D. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol**, v.37, p.115-26, 2001.
- 43 JIANG, Y. et al. Essential role of survivin in early brain development. **J Neurosci**, v.25, n.30, p.6692-70, Jul.2005.
- 44 JOHNSON, M.E.; HOWERTH, E.W. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. **Vet Pathol**, v.41, n.6, p.599-607, 2004.

- 45 JORDAN, R.C.K. et al. Advanced diagnostic methods in oral maxillofacial pathology. Part II: Immunohistochemical and immunofluorescent methods. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.93, n.1, p.56-74, 2002.
- 46 KANOJIA, D.; VAIDYA, M.M. 4-Nitroquinoline-1-oxide induced experimental oral carcinogenesis. **Oral Oncol**, 2006. Disponível em:
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TB6-4J557D5-1-1&_cdi=5134&_user=972052&_orig=browse&_coverDate=01%2F30%2F2006&_sk=999999999&view=c&wchp=dGLbVzb-zSkWb&md5=26b3546d4ce8ed5663292bd4c8717ede&ie=/sdatitle.pdf. Acesso em 23/04/2006.
- 47 KAPLAN, I.; ENGELBERG, J.; DAYAN, D. The effect of desalivation on 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinogenesis: a morphometric study of nucleolar organizer regions. **J Oral Pathol Med**, v.30, n.1, p.48-52, 2001.
- 48 KASIBHATLA, S.; TSENG, B. Why target apoptosis in cancer treatment? **Mol Cancer Therap**, v.2, p.573-80, 2003.
- 49 KERR, J.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v.26, p.239-57, 1972.
- 50 KIM, J.K. et al. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. **Lancet**, v.362, p.205-9, Jul.2003.

- 51 KIM, M.J. et al. Stage and mRNA expression of survivin in lymph node as prognostic indicators in patients with oral squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, v.224, p.253-61, 2005.
- 52 KITAKAWA, D. **Utilização do AgNOR no processo de carcinogênese quimicamente induzida pelo DMBA (9,10-dimetil-1,2- benzantraceno) em borda lateral lingual de hamsters sírio dourado (*Mesocricetus auratus*)** 2003, 130f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2003.
- 53 KOLAS, S. Investigation of normal human saliva for possible anticarcinogenic action and chemical carcinogenesis in mucous membrane. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.8, p.1192-203, 1955.
- 54 KRESHOVER, S.J.; SALLEY, J.J. Predisposing factors in oral cancer. **J Am Dent Assoc**, v.54, n.4, p.509-14, Apr.1957.
- 55 KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran**. Pathologic basis of disease. 7.ed. Philadelphia: Elsevier, 2005, 1525 p.
- 56 LEE, M.A. et al. Survivin expression and its clinical significance in pancreatic cancer. **BMC Cancer**, v.5: 127, Oct 4, 2005.
- 57 LEVY, B.M. The experimental production of carcinoma of the tongue in mice. **J Dent Res**, v.37, p.950, Sept./Oct. 1958.

- 58 LI, F.; ALTIERI, D.C. The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression. **Cancer Res**, v.59, p.3143-51, Jul.1999.
- 59 LI, F. et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. **Nature**, v.396, p.580-4, Dec.1998.
- 60 LIPPMAN, S.M.; SUDBO, J.; HONG, W.K. Oral cancer prevention and evolution of molecular-target drug development. **J Clin Oncol**, v.23, p.346-56, 2005.
- 61 LO MUZIO, L. et al. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. **Exp Mol Pathol**, v.70, p.249-54, 2001.
- 62 LO MUZIO, L. et al. Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. **J Dent Res**, v.82, n.11, p.923-8, 2003.
- 63 LO MUZIO, L. et al. Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Arch Oral Biol**, v.50, p.593-8, 2005.
- 64 LORO, L.L.; VINTERMYR, O.K.; JOHANNESSEN, A.C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. **J Oral Pathol Med**, v.32, p.125-38, 2003.

- 65 LOUREIRO, A.P.M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quim Nova**, v.25, n.5, p.777-93, 2002.
- 66 LOURO, I.D. O ciclo celular. In: LOURO, I.D. et al. **Genética molecular do câncer**. 2.ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002. Cap.7, p.80-90.
- 67 LOURO, I.D. Proto-oncogenes e genes supressores de tumor. In: LOURO, I.D. et al. **Genética molecular do câncer**. 2.ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002. Cap.6, p.63-79.
- 68 MAGALHÃES, F.A.C. **Estudo comparativo entre os aspectos citológicos e histológicos afeitos à evolução da carcinogênese induzida por DMBA (9, 10-dimetil-1, 2-benzantraceno) em bordo lingual de hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*)** 2004, 140f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2004.
- 69 MALAGUARNERA, L. Implications of apoptosis regulators in tumorigenesis. **Cancer Metastasis Revi**, v.23, p.367-87, 2004.
- 70 MAREFAT, M.P. The effect of the short dose schedule of DMBA application in inducing lingual neoplasia in inbred Syrian hamsters. **J Oral Pathol**, v.14, p.383-9, 1985.

- 71 MAREFAT, M.P.; SHKLAR, G. Experimental production of lingual leukoplakia and carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.44, n.4, p.578-86, Oct. 1977.
- 72 MESRI, M. et al. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus. **J Clin Invest**, v.108, n.7, p.965-9, Oct.2001.
- 73 MICHALIDES, R.J. Cell cycle regulators: mechanism and their role in aetiology, prognosis, and treatment of cancer. **J Clin Pathol**, v.52, n.8, p.555-68, Aug.1999.
- 74 MIYACHI, K. et al. Correlation between survivin mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer. **Gastric Cancer**, v.6, p.217-24, 2003.
- 75 MOGNETTI, B.; DI CARLO, F.; BERTA, G.N. Animal models in oral cancer research. **Oral Oncol**, v.42, 448-60, 2006.
- 76 MONTEIRO, A.D. **Estudo comparativo entre os aspectos clínicos e histopatológicos observados na evolução do carcinoma epidermóide (CE) quimicamente induzido por dimetil-1, 2-benzantraceno (DMBA) em língua de hamsteres sírios dourados (*Mesocricetus auratus*)** 2004, 126f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista. São José dos Campos, 2004.
- 77 MORI, H. et al. Control of cell proliferation in cancer prevention. **Mutation Res**, v.428, p.291-8, 1999.

- 78 MORRIS, A.L. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. **J Dent Res**, v.40, n.1, p.3-15, 1961.
- 79 NAGPAL, J.K.; DAS, B.R. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanisms and exploring the future directions for its effective management. **Oral Oncol**, v.39, p.213-21, 2003.
- 80 NEVILLE, B.W. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.1998. 705p.
- 81 NISHIMURA, A . Changes in Bcl-2 and Bax expression in rat tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinogenesis. **J Dent Res**, v.78, n.6, p.1264-9, Jun.1999.
- 82 NIWA, S.; UENO, S.; SHIRASU, R. Alteration of pRB expression in the development of rat tongue carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Oral Oncol**, v.37, p.579-85, 2001.
- 83 O'CONNOR, D.S. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. **Am J Pathol**, v.156, n.2, p.393-8, Feb.2000.
- 84 OHNE, M. et al. Experimental tongue carcinoma of rats induced by oral administration of 4-nitroquinolone 1-oxide (4NQO) in drinking water. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.59, n.6, p.600-7, Jun.1985.

- 85 OMELYANCHUK, L.V. et al. Key events of cell cycle: organization and regulation. **Rus J Genet**, v.40, n.3, p.293-310, 2004.
- 86 PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**, v.55, p.74-108, 2005.
- 87 PINTO, D.S.; CAVALARI, M.C. Epidemiologia do câncer da boca. In: TOMMASI, A.F. **Diagnóstico em patologia bucal**. 3. ed. São Paulo: Pancast, 2002. Cap. 24, p.391-406.
- 88 PITOT, H.C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v.72, n.3, p.962-70, Aug. 1993.
- 89 PROTZEL, M.; GIARDINA, A.C.; ALBANO, E.H. The effect of liver imbalance on the development of oral tumors in mice following the application of benzpyrene or tobacco tar. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.18, n.5, p.622-35, Nov.1964.
- 90 RAMOTAR, D. et al. A yeast homologue of the human phosphotyrosyl phosphatase activator PTPA is implicated in protection against oxidative DNA damage induced by the model carcinogen 4-Nitroquinoline 1-Oxide. **J Biol Chem**, v.273, n.34, p.21489-96, Aug.1998.
- 91 RAVI, D. et al. Apoptosis, angiogenesis and proliferation: trifunctional measure of tumour response to radiotherapy for oral cancer. **Oral Oncol**, v.37, p.164-71, 2001.

- 92 REED, J.C. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. **Semin Hematol**, v.34, p.9-19, 1997.
- 93 REED, J.C. Dysregulation of apoptosis in cancer. **J Clin Oncol**, v.17, n.9, p.2941-53, Sept.1999.
- 94 REED, J.C. The survivin saga goes in vivo. **J Clin Invest**, v.108, p.965-69, 2001.
- 95 RIBEIRO, D.A. **Evolução do carcinoma espinocelular na mucosa bucal induzido pela 4 NQO (4-nitroquinolina 1-óxido) em ratos Wistar** 2005. 106f. Tese (Doutorado em Medicina – Área de Patologia) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.
- 96 RIBEIRO, D.A.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, M.E.A. Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Int J Exp Pathol**, v.86, p.375-81, 2005.
- 97 RIBEIRO, D.A. et al. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosal cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. **Oral Oncol**, v.40, p.910-15, 2004.
- 98 ROSSIT, A.R.B.; FROES, N.D.T. Epidemiologia molecular – xenobióticos e susceptibilidade genética na etiologia do câncer. In: LOURO, I.D. et al. **Genética molecular do câncer**. 2.ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002. Cap. 3, p.31-48.

- 99 SABBAGA, J. Oncogenes e antioncogenes. In: PARISE JUNIOR, O. **Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos**. São Paulo: Sarvier, 2000. Cap.4, p.23-8.
- 100 SALLEY, J.J. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the Syrian hamster. **J Dent Res**, v.33, n.2. p.253-62, Apr.1954.
- 101 SALLEY, J.J. Histologic changes in the hamster cheek pouch during early hydrocarbon carcinogenesis. **J Dent Res**, v.36, n.1, p.48-55, Feb.1957.
- 102 SCHIMMER, A.D. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. **Cancer Res**, v.64, p.7183-90, 2004.
- 103 SCHOELCH, M.L. et al. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.35, p.77-85, 1999.
- 104 SCHWARTZ, J.L. et al. Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. **Oral Oncol**, v.36, p.225-35, 2000.
- 105 SHANGARY, S.; JOHNSON, D.E. Recent advances in the development of anticancer agents targeting cell death inhibitors in the Bcl-2 protein family. **Leukemia**, v.17, n.8, p.1470-81, Aug.2003.

- 106 SHARIAT, S.F. et al. Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer. **J Urol**, v.171, p.626-30, Feb.2004.
- 107 SHARIAT, S.F. et al. Expression of survivin and apoptotic biomarkers in benign prostatic hyperplasia. **J Urol**, v.174, p.2046-50, 2005.
- 108 SHEER, C.J. Cancer cell cycles. **Science**, v.274, n.5293, p.1672-77, Dec 1996.
- 109 SMITH, S.D. et al. Urine detection of survivin and diagnosis of bladder cancer. **J Am Med Assoc**, v.285, p.324-8, 2001.
- 110 SOBIN, L.H. et al. **TNM classification of malignant tumours**. International Union Against Cancer. 5th ed. New York: Wiley–Liss, 1997.
- 111 STEIDLER, N.E.; READE, P.C. Experimental induction of oral squamous cell carcinomas in mice with 4-hydroquinoline-1-oxide. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.57, n.5, p.524-31, May.1984.
- 112 STEIDLER, N.E. & READE, P.C. Initiation and promotion of experimental carcinogenesis in mice. **J Oral Patol**, v.15, p.43-7, 1986.
- 113 STEWART, B.W.; COATES, A.S. Cancer prevention: a global perspective. **J Clin Oncol**, v.23, n.2, p.392-403, Jan.2005.

- 114 SUN, S.Y. ; HAIL JUNIOR, N.; LOTA, R. Apoptosis as a novel cancer chemoprevention. **J Natl Cancer Inst**, v.96, p.662-72, 2004.
- 115 TANAKA, C. et al. Expression of an inhibitor of apoptosis, survivin, in oral carcinogenesis. **J Dent Res**, v.82, n.8, p.607-11, 2003.
- 116 TESSEMA, M.; LEHMANN, U.; KREIPE, H. Cell cycle and no end. **Virchows Arch**, v.444, p.313-23, 2004.
- 117 THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science**, v.267, n.5203, p.1456, Mar.1995.
- 118 THORNBERRY, N.A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v.281, n.5381, p.1321 , Aug.1998.
- 119 TODD, R.; DONOFF, B.; WONG, D.T.W. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. **J Oral Maxillofac Surg**, v.55, p.613-23, 1997.
- 120 TOMMASI, A.F. Semiologia do câncer bucal. In:____. **Diagnóstico em patologia bucal**. 3.ed. São Paulo: Pancast, 2002. Cap. 25, p.407-40.
- 121 VERED, M.; YAROM, N.; DAYAN, D. 4NQO oral carcinogenesis: animal models, molecular markers and future expectations. **Oral Oncol**, v.41, p.337-39, 2004 .

- 122 VETTER, C.S. et al. Cytoplasmic and nuclear expression of survivin in melanocytic skin lesions. **Arch Dermatol Res**, v.297, p.26-30, 2005.
- 123 XIANG, Y. et al. Prognostic value of survivin and livin in nasopharyngeal carcinoma. **Laryngoscope**, v.116, n.1, p.126-30, 2006.
- 124 XING, Z. et al. Essential role of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in T cell development, maturation, and homeostasis. **J Exp Med**, v.199, n.1, 69-80, 2004.
- 125 WALLENIIUS, K. Experimental oral cancer in the rat. With special reference to the influence of saliva. **Acta Path Microbiol Scand**, Suppl.180, 1966 apud WALLENIIUS, K.; LEKHOLM, U. Influence of saliva on epidermal cancer in rat induced by water or fat-soluble carcinogens. **Odont Revy**, v.24, p.115-26, 1973.
- 126 WALLENIIUS, K.; LEKHOLM, U. Influence of saliva on epidermal cancer in rat induced by water or fat-soluble carcinogens. **Odont Revy**, v.24, p.115-26, 1973.
- 127 WALLENIIUS, K.; LEKHOLM, U. Oral cancer in rats induced by the water soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. **Odont Revy**, v.24, p.39, 1973 apud WALLENIIUS, K.; LEKHOLM, U. Influence of saliva on epidermal cancer in rat induced by water or fat-soluble carcinogens. **Odont Revy**, v.24, p.115-26, 1973.
- 128 WEINBERG, R.A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Res**, v.49, p.3713-21, July.1989.

- 129 WEISBURGER, E.K. General principles of chemical carcinogenesis. In: WAALKES, M.P.; WARD, J.M. **Carcinogenesis**. New York: Raven Press, 1994. Cap.1, p.1-2.
- 130 WEISS, L. The molecular genetics of progression and metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.19, p.327-44, 2000.
- 131 WILLIAMS, G.M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. **Toxicol**, v.166, p.3-10, 2001.
- 132 WILSON, D.F.; VREUGDENBURG, A.; WIEBKIN, O.W. Proteoglycan changes in carcinogen (4NQO)-treated rat tongue mucosa. **J Oral Pathol Med**, v.24, p.113-9, 1995.
- 133 WONG, P.N.C.; WILSON, D.F. 4 Nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis in the rat palate. **J Oral Pathol**, v.12, p.375-84, 1983.
- 134 YAKUSHIJI, T. et al. Over-expression of DNA methyltransferases and CDKN2A gene methylation status in squamous cell carcinoma of oral cavity. **Int J Oncol**, v.22, n.6, p.1201-7, 2003.
- 135 YAMAMOTO, T.; TANIGAWA, N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. **Med Electron Microsc**, v.34, p.207-12, 2001.

- 136 YAMAMURA, T. et al. An experimental study of intraoral carcinogenesis in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.39, n.1, p.87-102, Jan.1975.
- 137 YANG, D.; WELM, A.; BISHOP, J.M. Cell division and cell survival in the absence of survivin. **PNAS**, v.101, n.42, p.15100-5, Oct.2004.
- 138 YU, J.; ZHANG, L. Apoptosis in human cancer cells. **Curr Opin Oncol**, v.16, p.19-24, 2003.
- 139 ZAFFARONI, N.; PENNATI, M.; DAIDONE, M.G. Survivin as a target for new cancer interventions. **J Cell Mol Med**, v.9, n.2, p.360-72, 2005.

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CÂMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

Comissão de Ética na Experimentação Animal

BOTUCATU, SP - RUBIÃO JÚNIOR - CEP 18618-970 - FONE E FAX (014) 6802-6143

CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 252 , sobre o projeto de pesquisa intitulado “Evolução do carcinoma espinocelular na mucosa bucal induzido pela 4-nitroquinolina 1-óxido (NQO) em ratos wistar”, de autoria de Daniel Araki Ribeiro, orientada pela Profª. Drª. Mariângela Esther Alencar Marques, com a colaboração da Profª Drª Daisy Maria Fávero Salvadori, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Botucatu, em 25 de novembro de 2002

Alteração no Projeto de Pesquisa aprovado em 22/11/2002

Prof. Dr. Antero F. Macedo Miranda
Presidente da CEEA



Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA

Projeto original aprovado com o Título : " Estudo da evolução do carcinoma espinocelular induzido pelo (DMBA) (dimetilbenzoantraceno) em ratos, aprovado em 29 de abril de 2.002.

Anexo B – Autorização do Departamento de Patologia FMB – UNESP

unesp 
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

FACULDADE DE MEDICINA
CAMPUS DE BOTUCATU


DEPARTAMENTO DE
PATOLOGIA
deppato@fmb.unesp.br

Distrito de Rubião Júnior, s/nº - Caixa Postal 564 - CEP 18.618-000 - Botucatu - SP - Brasil
☎(014) 3811-6238 / 3811-6146 / 6802-6042 - Fax (014) 3815-2348

Botucatu, 02 de maio de 2006.

AUTORIZAÇÃO

Vimos por meio desta autorizar o **Prof. Dr. Luiz Antônio Guimarães Cabral** a usufruir as dependências do Departamento de Patologia da FMB-UNESP, bem como utilizar os reagentes necessários para a realização da tese do seu aluno de Doutorado Dárcio Kitakawa.

Sem mais para o momento, subscrevemo-nos;



Prof. Dr. Mariângela Esther Alencar Marques
Professora Assistente



Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro
Pesquisador de Pós-doutorado

KITAKAWA, D. Immunohistochemical analysis of inhibitor of apoptosis protein, survivin, in rat tongue mucosa induced by 4-nitroquinoline 1-oxide 2006. 80f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal – Área de concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2006.

ABSTRACT

4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO)-induced rat tongue carcinogenesis is a useful model for studying the development of squamous cell carcinoma phase by phase. Taking into consideration apoptosis plays an important role in tumorigenesis, the aim of this study was to investigate the expressivity of survivin, a member of the inhibitor apoptotic protein family, during tongue carcinogenesis induced by 4NQO through immunohistochemistry. Male Wistar rats were distributed into three groups of 10 animals each and treated with 50 ppm 4NQO by drinking water for four, 12 or 20 weeks. A total of ten animals were used as negative control. Although no histological changes were induced in the epithelium after 4 weeks of carcinogen exposure, survivin was detected in the cytoplasm within granular and superficial layers. In dysplastic lesions with 12 weeks of carcinogen exposure, cytoplasmic survivin was evidenced in the superficial layer of epithelium only. In well-differentiated squamous cell carcinoma induced after 20 weeks of treatment with 4NQO, cytoplasmic survivin was expressed in some cells adjacent to keratin pearls. No immunoreactivity was detected in the negative control group. Taken together, our results suggest that expression of cytoplasmic/nuclear survivin is an early event during 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis and may provide a useful toll for the identification of lesions at higher risk of progression into oral squamous cell carcinoma.

KEYWORDS: 4-nitroquinoline 1-oxide; survivin; squamous cell carcinoma; animals; comparative study

Autorizo a reprodução xerográfica deste trabalho.

MESTRE DÁRCIO KITAKAWA