

CELINA FAIG LIMA

**EXPRESSÃO DA SURVIVINA EM DIFERENTES
CONDIÇÕES RELACIONADAS À CARCINOGENESE
INTRA-BUCAL HUMANA:**

Survivina na carcinogênese humana

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

**Orientadora: Profa. Adj. Janete Dias Almeida
Co-orientadora: Dra. Jaqueline Scholz Issa**

**São José dos Campos
2010**

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia
prático para Normalização de Trabalhos Acadêmicos da
FOSJC. São José dos Campos: FOSJC/UNESP; 2008

L628e Lima, Celina Faig.
Expressão da survivina em diferentes condições relacionadas à
carcinogênese intra-bucal humana / Celina Faig Lima. __ São José dos
Campos : [s.n.], 2010
90f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de
São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2010.
Orientador: Prof. Dr. Janete Dias Almeida
Co- orientador: Dra Jaqueline Scholz Issa

1. Survivina. 2. Citodiagnóstico. 3. Tabagismo. 4. Carcinogênese. 5.
Carcinoma epidermóide. 6. Mucosa bucal. I. Almeida, Janete Dias. II.
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos
Campos. III. Título

tD79

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste
trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde
que citada a fonte.

São José dos Campos, 19 de Julho de 2010.

Assinatura:

E-mail: celinafaig@yahoo.com.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Janete Dias Almeida (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Adj. Luiz Antonio Guimarães Cabral

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Profa. Dra. Renata Falchete do Prado

Escola Superior de Cruzeiro
“Prefeito Hamilton Vieira Mendes”

Profa. Tit. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa

Faculdade de Odontologia
Universidade de São Paulo – FOU SP

São José dos Campos, 19 de Julho de 2010.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Eduardo, pelo apoio e compreensão dos momentos dedicados a este trabalho, e pelo exemplo de dedicação aos estudos.

Aos meus pais, Camilo e Fátima, pelo amor, carinho e por todas as oportunidades que me proporcionaram educação e estudo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. José Roberto Rodrigues e do vice-diretor Prof. Carlos Augusto Pavanelli.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito.

A minha orientadora, Profa. Adj. Janete Dias Almeida, pelo carinho, atenção e amizade cultivados ao longo de todos estes anos.

A Dra Jaqueline Scholz Issa e aos participantes do Programa Ambulatorial de Tratamento de Tabagismo do Instituto do Coração (INCOR-HCFMUSP) pelo suporte oferecido para realização desta pesquisa.

Ao Prof. Adj. Luiz Antonio Guimarães Cabral, pela convivência e pela transmissão de conhecimentos e de filosofia de trabalho.

Ao CNPq pelo financiamento deste trabalho: processo: 472759/2008-6. Edital MCT/CNPq 14/2008 - Universal A.

A Érica Crastechini, pela parceria na coleta do material citológico e realização da imunoistoquímica.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

A técnica Ana Lourdes pela ajuda na realização das colorações.

Aos colegas da pós-graduação, pelo convívio e troca de conhecimentos, especialmente Mônica, Vitor e Luis Felipe, pela parceria no atendimento do ambulatório de Propedêutica Estomatológica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Gráfico da expressão da survivina segundo o consumo diário de cigarros.....	52
Figura 2 -	Gráfico da expressão da survivina nos sexos masculino e feminino segundo o total de casos avaliados (30), escore e localização intra-bucal.....	56
Figura 3 -	Gráfico da expressão da survivina em leucoplasias bucais em diferentes camadas epiteliais.....	60
Figura 4 -	Gráfico da expressão da survivina em carcinomas epidermóides bucais.....	62
Figura 5 -	Expressão da survivina na citologia de indivíduos tabagistas.....	63
Figura 6 -	Expressão da survivina em leucoplasias intra-bucais.....	64
Figura 7 -	Expressão da survivina em carcinomas epidermóides intra-bucais.....	65
Figura 8 -	Células da mucosa de indivíduos fumantes coradas e analisadas pelo método de Papanicolaou.....	66

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 -	Critérios para diagnóstico de displasias.....	40
Quadro 2 -	Anticorpo policlonal para survivina.....	42
Quadro 3 -	Critérios utilizados para classificação de Papanicolaou.....	47
Tabela 1 -	Expressão da survivina em esfregaços citológicos do bordo lingual segundo o tempo de tabagismo.....	53
Tabela 2 -	Expressão da survivina em esfregaços citológicos do assoalho bucal segundo o tempo de tabagismo.....	53
Tabela 3 -	Expressão da survivina em esfregaços citológicos em distribuição de freqüência relativa (%) de 19 pacientes etilistas.....	54
Tabela 4 -	Expressão da survivina em esfregaços citológicos segundo as diferentes faixas etárias.....	55
Tabela 5 -	Número de casos classificados como classe I e classe II.....	57
Tabela 6 -	Componentes dos esfregaços em assoalho bucal.....	57
Tabela 7 -	Componentes dos esfregaços em bordo lingual.....	58

Tabela 8 -	Expressão da survivina em leucoplasias bucais em diferentes locais anatômicos.....	59
Tabela 9 -	Expressão da survivina em diferentes graus de displasia epitelial.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BIR = Baculoviral

BIRC5 = Baculoviral IAP repeat-containing 5

Bcl2 = B-cell lymphoma

CE = Carcinoma epidermóide

CK = citoqueratina

CPC = complexo cromossômico de passagem

DAB = diaminobenzidina

DE = displasia epitelial

DMBA = 7,12-dimetilbenzantraceno

FOSJC = Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

gl = grau de liberdade

HE = hematoxilina-eosina

HPV = Papilomavirus humano

Hsp 90 = heat shock protein 90

IAP = proteína inibidora da apoptose

INCOR-HCFMUSP = Instituto do Coração do Hospital das Clínicas
da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

LAP = Laboratório de Apoio à Pesquisa

LPB = líquen plano bucal

OMS = Organização Mundial da Saúde

PCNA = Proliferating Cell Nuclear Antigen

pH = potencial hidrogeniônico

RT-PCR = reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa

TNF = fator de necrose tumoral

TRIS = tris(hidroximetil)aminometano

UNESP = Universidade Estadual Paulista

VEGF = fator de crescimento endotelial vascular

χ^2 = chi-quadrado

4- NQO = 4-nitroquinilona 1-óxido

°C = graus Celsius

g = grama

ml = mililitro

Lima, CF. Expressão da survivina em diferentes condições relacionadas à carcinogênese intra-bucal humana. [tese] São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP Univ. Estadual Paulista; 2010.

RESUMO

A survivina é uma proteína inibidora da apoptose que desempenha papel de controle no ciclo celular e no mecanismo de carcinogênese. Este trabalho teve como proposição verificar a correlação clinicopatológica da expressão da survivina nas diferentes condições relacionadas à carcinogênese intra-bucal humana, o que pode ser útil para destacar aspectos importantes das etapas da carcinogênese bucal. Foram constituídos três grupos, formados em parte por material citológico coletado de pacientes participantes do Programa Ambulatorial de Tratamento de Tabagismo do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (INCOR-HCFMUSP); e por material que se encontra incluído em blocos de parafina no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos FOSJC – UNESP. O primeiro grupo foi constituído por material citológico obtido do bordo lateral lingual esquerdo e assoalho bucal de 30 pacientes que fumavam mais de 20 cigarros/dia/10anos e que não apresentavam histórico de neoplasia bucal maligna, nem sinais clínicos visíveis no local avaliado; o segundo grupo foi constituído por amostras teciduais de 21 pacientes com lesões brancas clinicamente classificadas como leucoplasias. O terceiro grupo foi formado por 42 amostras teciduais de pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide bucal. Os pacientes que foram submetidos à citologia esfoliativa foram examinados através de anamnese, exame clínico extra e intra -bucal. A citologia esfoliativa foi realizada com *cytobrush* para obtenção de duas lâminas de cada local selecionado. Após a realização da imunoistoquímica com anticorpo primário anti-survivina as lâminas foram analisadas qualitativamente através da microscopia óptica. Uma lâmina de assoalho e uma de língua foram coradas e avaliadas pelo método de Papanicolaou. A análise estatística foi realizada pelo teste exato de Fisher, X^2 e Mann-Whitney. A survivina foi positiva em 100% do material citológico dos tabagistas; 85,7% das leucoplasias bucais e 83,3% de CE bucal. Pelo teste exato de Fisher não foi observada associação entre a expressão da survivina e o consumo diário de cigarros e tempo de tabagismo na língua ou assoalho bucal respectivamente: língua ($p= 0,68$); ($p= 0,21$) e assoalho bucal: ($p= 0,69$); ($p= 0,69$). No entanto, foi observada maior expressão da survivina em assoalho bucal do que na língua conforme o teste de Mann-Whitney ($p= 0,001$). A marcação da survivina não foi

estatisticamente correlacionada com o consumo de cigarros, embora tenha ocorrido de forma mais intensa no assoalho bucal. A expressão da survivina na mucosa bucal de fumantes crônicos, em leucoplasias bucais e CE bucal avaliados indicam que a survivina é uma proteína expressa em todas as etapas relacionadas à carcinogênese bucal.

PALAVRAS – CHAVE: survivina, citodiagnóstico, displasia epitelial, mucosa bucal, carcinoma epidermóide, tabagismo, carcinogênese.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	05
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	06
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	08
RESUMO	10
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Carcinoma epidermóide e citologia esfoliativa.....	16
2.2 Leucoplasias.....	21
2.3 Mecanismo de constituição das neoplasias.....	23
2.4 Survivina.....	27
3 PROPOSIÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODO	37
4.1 Seleção das amostras.....	37
4.2 Processamento das amostras teciduais.....	39
4.3 Padronização das amostras teciduais de leucoplasias bucais.....	39
4.4 Realização da citologia esfoliativa e fixação das amostras.....	41

4.5 Realização da imunoistoquímica.....	42
4.6 Realização da técnica de Papanicolaou.....	45
4.7 Avaliação do material citológico.....	46
4.8 Avaliação do material histopatológico.....	48
4.9 Análise estatística.....	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Perfil dos tabagistas.....	50
5.2 Expressão da survivina x consumo de cigarros.....	51
5.3 Expressão da survivina x ingestão de bebidas.....	53
5.4 Expressão da survivina x idade e sexo.....	54
5.5 Análise de Papanicolaou.....	56
5.6 Leucoplasias bucais.....	59
5.7 Carcinomas epidermóides bucais.....	61
6 DISCUSSÃO.....	67
7 CONCLUSÃO.....	73
8 REFERÊNCIAS.....	74
APÊNDICE.....	86
ANEXO A.....	89
ANEXO B.....	90
ANEXO C.....	91
ANEXO D.....	92
ABSTRACT.....	93

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide (CE) representa cerca de 90% das neoplasias malignas diagnosticadas em boca (Lo Muzio et al. 2001). O processo de carcinogênese, que culmina com o CE, envolve diferentes etapas controladas por moléculas protéicas codificadas geneticamente mediante a ação de agentes genotóxicos. O conhecimento a respeito das doenças neoplásicas já evoluiu bastante, especialmente com as informações obtidas pelos estudos que utilizam a biologia molecular, permitindo a identificação de diversos mecanismos intra e extra-celulares de controle do ciclo celular ajudando na compreensão do comportamento biológico de diferentes tipos de neoplasias.

Tais informações possuem valor predictivo principalmente nos casos de lesões com potencial de transformação maligna com variados graus de displasia.

No entanto, alterações iniciais e mudanças no ciclo celular expressas nas fases de iniciação e promoção da carcinogênese, não são observadas ao exame clínico de rotina. A aplicação de exames complementares não invasivos, como a citologia esfoliativa, possibilita a análise de alterações celulares onde não há qualquer alteração visível clinicamente (Almeida e Cabral 1992; Almeida et al. 1994).

A citologia esfoliativa foi preconizada como método de detecção precoce de câncer de colo uterino por Papanicolaou e Traut em 1941 e introduzida na odontologia por Montgomery e Von Haan em 1951. Considerando-se as diversas vantagens do citodiagnóstico, como baixo custo e não invasividade e lembrando que, até mesmo as células das camadas mais superficiais do epitélio da mucosa apresentam a expressão de proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular, percebe-se a aplicabilidade da técnica de imunistoquímica com o objetivo de auxiliar na obtenção de um diagnóstico mais rápido e favorecer o prognóstico de lesões bucais.

A survivina é uma proteína cujo papel no controle do ciclo celular e no mecanismo de carcinogênese tem apresentado relevância. Sua função está relacionada ao funcionamento do ciclo celular, no qual desempenha uma ação inibidora da apoptose, conferindo à célula uma sobrevivência mais prolongada (O'Connor et al. 2000; Smith et al. 2001). Além de ser expressa em casos de CE já instalados, a survivina pode ser utilizada como um indicador prognóstico para lesões com potencial de transformação maligna.

Destarte, verifica-se a oportunidade de realizar uma correlação clinicopatológica da expressão da survivina em diferentes condições relacionadas à carcinogênese intra-bucal através do exame citológico e histopatológico, para estabelecer um perfil evolutivo do carcinoma bucal, o que poderá nortear a escolha de tratamento e prognóstico para a doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide e citologia esfoliativa

O carcinoma epidermóide (CE) é a neoplasia maligna bucal mais freqüente, resultado de um processo denominado carcinogênese que pode ser didaticamente dividido em etapas de iniciação, promoção e progressão (Pitot et al. 1991).

As substâncias participantes deste processo recebem o nome de carcinógenos e atuam de diferentes maneiras, direta ou indiretamente, nos diferentes estágios da carcinogênese. A carcinogênese pode ser induzida por uma variedade de agentes agrupados em quatro categorias relativamente distintas: químicos, físicos, biológicos e genéticos (Pitot et al. 1991).

Entre os agentes carcinógenos químicos consagrados estão o tabaco e o álcool. O tabaco atua tanto como agente iniciador como promotor deste processo, sendo por este motivo elemento fundamental no processo que culmina com o CE bucal. A iniciação ao processo de carcinogênese causada pelo tabaco leva ao dano permanente do DNA celular, fixado com o processo de síntese do DNA, gerando irreversibilidade deste estágio. Segue-se então a promoção pela persistência do agente iniciador ou associação com outro carcinógeno, podendo ser distinguida das fases de iniciação e

progressão pela reversibilidade. Outra possibilidade é a exposição a uma dose tão elevada do carcinógeno que esta fase torna-se praticamente inexistente, pulando do estágio de iniciação à progressão. Não existe consenso sobre o limiar para iniciação da carcinogênese, ou a dose-limite de cada carcinógeno. A fase de progressão é caracterizada pela instabilidade cariótípica e irreversibilidade. As alterações genômicas e estruturais nesta etapa estão diretamente relacionadas com o aumento do crescimento da neoplasia, taxa de invasividade e capacidade metastática das células neoplásicas (Pitot et al. 1991).

O álcool atua na mucosa bucal aumentando a permeabilidade da membrana celular segundo Mc Cance e Huether (1998) e Ogden et al. (2005). Para Ogden et al. (2005) ele também pode causar alterações na endocitose levando a diminuição da área citoplasmática. A concentração do etanol é muito importante na carcinogênese bucal, pois ele é mais efetivo em maiores diluições do que em maiores concentrações onde atua como fixador, reduzindo a permeabilidade da membrana. Segundo Seitz e Stickel (2009) o metabólito do álcool que atua na carcinogênese é o acetaldeído (AA), resultante da primeira oxidação do etanol. O AA é um produto tóxico e mutagênico e é degradado no organismo por enzimas codificadas geneticamente. Por este motivo, a presença de álcool nos colutórios bucais é questionada por Mc Cullough e Farah (2008). De acordo com os mesmos autores a ação sobre a mucosa bucal causa a descamação das células, hiperqueratose, ulcerações, gengivite e dor e pode contribuir com o processo de carcinogênese bucal.

O consumo destes carcinógenos coloca o câncer bucal como o 18º tipo mais comum em homens do mundo inteiro e, em certas partes da Ásia o terceiro tipo de câncer mais prevalente (Reibel 2005). Segundo Reibel (2003) a associação tabaco e álcool explicam 75-90% dos casos de CE bucais.

A identificação precoce do câncer bucal é essencial, resultando em um índice de sobrevida maior do que o de outros tipos de câncer (Mashber e Samit 1989), podendo ser realizada através de correta condução do processo diagnóstico e realização de exames complementares como exames citológicos e biópsias.

O exame citológico propõe fácil e rápida aplicação tanto nos casos de lesões com suspeita de malignidade, como para lesões com potencial de transformação maligna; e ainda como metodologia diagnóstica e predictiva no monitoramento não só de pacientes já tratados, mas daqueles pertencentes a grupos de risco (Holland 2000; Acha et al. 2005), o que se deve pelo fato de ser minimamente invasiva e sem a necessidade de anestesia prévia (Epstein et al. 2002) . Sua aplicação auxilia no biomonitoramento de pacientes que fazem uso de substâncias carcinógenas e diversos agentes genotóxicos (Lima 2007).

A citologia esfoliativa pode ser utilizada na estomatologia para estudo de neoplasias, processos infecciosos e auto-imunes, e é um importante recurso de acompanhamento em casos de neoplasias já tratadas (Almeida e Cabral 1992; Almeida et al. 1994; Tavares 2004; Tommasi 2002). Durante algum tempo, a confiabilidade da técnica foi questionada devido a erros de coleta e

resultados falsos negativos emitidos por profissionais com pouca experiência (Acha et al. 2005; Freitas et al. 2004). Folsom et al. (1972) obtiveram 31% de resultados falsos negativos em avaliação de 148 pacientes, no entanto diagnosticaram 03 casos onde não havia suspeita clínica de malignidade. Sandler et al. (1958) também compararam com sucesso a acuidade da citologia em relação ao diagnóstico obtido através da biópsia (92%).

A citologia esfoliativa foi inicialmente utilizada por Papanicolaou e Traut em 1941, para diagnóstico de câncer de colo uterino. No entanto, o primeiro relato de sua utilização para diagnóstico de carcinomas ocorreu no século XIX, quando Beale (1860) descreveu os achados citológicos em escarro de uma paciente com carcinoma de orofaringe. A técnica foi introduzida para uso na odontologia somente em 1951 por Montgomery e Von Haan, em estudo de dez casos de leucoplasias intra-bucais, quando encontrou aumento da queratinização das áreas leucoplásicas sem alterações sugestivas de malignidade.

Nas últimas décadas novas técnicas tanto de coleta dos raspados, fixação (Sthipintawong et al. 1996), como de análise do material possibilitaram novamente a divulgação e ampliação de uso da citologia esfoliativa. Entre os instrumentos de coleta mais difundidos está o *cytobrush*, que permite coleta tanto das células mais superficiais do epitélio quanto das células da camada intermediária (Jones et al. 1994), além de melhorar a dispersão do número de células por campo nas lâminas obtidas (Ogden et al. 1992; Queiroz et al. 2006), contribuindo para melhor qualidade final dos esfregaços e diminuição

de falsos negativos. Atualmente entre estes instrumentos de coleta destaca-se um instrumento de coleta com duas superfícies cortantes: *brush biopsy* (Felefli e Flaitz 2000), que apesar de possibilitar coleta de células das camadas mais profundas representa um procedimento mais invasivo e que não revela vantagens da citologia sobre o procedimento cirúrgico da biópsia (Mehrota et al. 2009). Quanto a fixação do material Suthipintawong et al. (1996) avaliaram 23 protocolos de fixação através de análise citomorfométrica e imunoreatividade das células após a fixação. O álcool absoluto demonstrou 100% de resultados favoráveis.

Buscando identificar alterações celulares iniciais causadas pelo tabaco através do exame citológico, Ogden et al. (1990) pesquisaram o efeito do cigarro sobre a mucosa bucal através da citomorfometria de raspados citológicos, constatando um aumento da área nuclear e citoplasmática das células do grupo de pacientes fumantes.

Pavanello et al. (2006) em análise de esfregaços de universitários fumantes observaram menor maturação epitelial nas células da mucosa jugal, quando comparados aos não fumantes. Oliveira et al. (2007) através da citologia esfoliativa, pelo método de Papanicolaou, analisaram material citológico da mucosa bucal de 30 fumantes (20 cigarros/dia/ durante 30 anos) em comparação com 30 não-fumantes, ambos os grupos sem alterações da mucosa bucal clinicamente evidentes. Concluíram que a mucosa bucal de pacientes fumantes apresentou maior quantidade de alterações inflamatórias e

queratinização do que pacientes não fumantes, e menor maturação celular exceto pelas alterações nucleares.

Fontes et al. (2008) verificaram atividade proliferativa aumentada das células do bordo lingual e assoalho bucal, em análise de material citológico de 22 fumantes (20 cigarros/dia/durante 30 anos) sem qualquer alteração clínica da mucosa, por meio da histoquímica das AgNORs. Os mesmos autores (Fontes et al. 2008) verificaram, através da análise de Papanicolaou, além do aumento de NORs/núcleo na mucosa bucal do grupo tabagista através da impregnação pela prata, um aumento nas alterações inflamatórias em 90% dos fumantes de 87% do grupo não fumante.

Desta forma, é importante associar o método da citologia esfoliativa a métodos de estudo dos raspados que possuam valor predictivo, principalmente em grupos de risco como os indivíduos fumantes.

2.2 Leucoplasias

As leucoplasias são definidas como placas brancas que não podem ser caracterizadas clinicamente ou patologicamente como qualquer outra doença (Neville et al. 1999; Barnes 2005). O percentual de transformação maligna destas lesões é muito variável bem como o tempo de evolução destas lesões para CE bucal (Tanaka et al. 2003; Sudbo et al. 2006; Warnakulasuriya et al. 2008).

Para elucidar o potencial de transformação maligna a gradação histológica das atipias presentes em cada caso é realizada. Warnakulasuriya et al. (2008) discutem três diferentes sistemas de classificação de leucoplasias: o sistema proposto pela organização mundial da saúde (OMS 2005); o de Smith e Pindborg e o de Ljubljana. Na classificação de Smith e Pindborg (1969) o patologista avalia 13 características como presente ou ausente, e para cada grau de displasia existe um número destas características presentes em escala ordinal. Para os autores, a classificação da OMS (2005) tem maior praticidade, enquanto a classificação de Ljubljana esbarra em dificuldades de adaptação à nomenclatura como a utilização do termo hiperplasia como base e a definição de hiperplasia atípica nos casos de lesões displásicas.

Van der Waal et al. 2000 propõem uma classificação baseada no tamanho (L), local intra-bucal de risco (S), homogeneidade clínica (C), e grau de displasia epitelial (P).

O estudo de biomarcadores também tem sido utilizado com intuito de revelar precocemente as lesões com maiores chances de transformação maligna. Assim, as pesquisas conduzidas nesta área buscam o marcador que possui maior valor predictivo de transformação maligna (Kustner et al. 2004).

Sudbo et al. (2006) analisaram a influência da ressecção cirúrgica e aneuploidia na mortalidade causada por lesões de leucoplasias bucais que sofreram transformação para CE. Dos 150 casos analisados 47 sofreram transformação maligna (5 casos apresentaram diploidia, 16 tetraploidia, e 26 aneuploidia). A margem

cirúrgica após remoção da lesão de leucoplasia não teve influência estatisticamente significativa sobre o desenvolvimento posterior de carcinoma ($p=0,95$). Aneuploidia também esteve mais relacionada à agressividade do carcinoma e letalidade ($p=0,03$).

A survivina foi considerada por Smith et al. (2009) um dos melhores biomarcadores predictivos de transformação maligna de leucoplasias bucais em CE juntamente com aneuploidia, metaloproteinases e conteúdo de DNA em revisão sistemática de bases científicas internacionais de estudos tipo coorte longitudinais e caso-controle.

2.3 Mecanismo de constituição das neoplasias

Nas células neoplásicas existe a perda do controle da proliferação celular, as quais proliferam sem necessidade de renovação. Nos organismos saudáveis esta proliferação é controlada por genes que codificam proteínas ativas neste processo, que podem ser subdivididos em: protooncogenes, genes supressores de tumor e genes reguladores da apoptose (Rossi e Pinho 1999; Tessema et al. 2004).

A proliferação celular alterna mitose e intérfase. Esta última é composta pelas fases G1, S e G2. Na fase G1 ocorre a síntese de RNA e proteínas; em seguida ocorre a duplicação do DNA na fase S e na fase G2 ocorre preparação das duas cromátides-irmãs

para início da mitose (Rossi e Pinho 1999; Junqueira e Carneiro 2004; Tessema et al. 2004).

A mitose inicia-se com a condensação cromossômica dando início a prófase onde as cromátides irmãs ficam unidas pelo centrômero e ocorre formação do fuso e microtúbulos; a prometáfase é a etapa seguinte onde ocorre desintegração da membrana nuclear; na metáfase a condensação cromossômica atinge seu ponto máximo, bem como a contração das fibras do fuso; segue-se a divisão dos centrômeros na anáfase com separação das cromátides-irmãs. A telófase representa a etapa final da mitose quando os cromossomos começam a descontrair-se e a serem envoltos por uma membrana nuclear; também ocorre a citocinese, ou divisão citoplasmática, que dá origem às duas células-filhas diplóides e idênticas à célula mãe (Rossi e Pinho 1999; Junqueira e Carneiro 2004).

No ciclo celular existem os pontos de controle chamados *check points*, que ocorrem de G1 para S (*restriction point*), dentro da fase S, e de G2 para M (início da mitose). Falhas nos *check points* podem levar à perpetuação de danos ao material genético e até a formação de células com diferentes tipos de anormalidades, como células gigantes com formações nucleares aberrantes derivadas de um processo denominado catástrofe mitótica (Vankifahmetoglu et al. 2008).

Quando alterações são detectadas durante o ciclo celular, a célula é encaminhada para apoptose, que representa a morte celular programada (Schimmer 2004), e ocorre pela ativação das proteínas da família das cisteinilproteases, mais conhecidas como

caspases. Este mecanismo existe para extinguir células que sofreram alterações irreversíveis principalmente em seu material genético, como é o caso da célula neoplásica, ou como método de controle da renovação de células já “envelhecidas”. A deficiência na apoptose está associada a doenças como as neoplasias malignas. O excesso de eventos apoptóticos pode desencadear a expressão de doenças autoimunes como a AIDS, doenças hematológicas, desordens neurodegenerativas como doença de Alzheimer, Parkinson, atrofia muscular espinhal e esclerose amiotrófica lateral (Nikitatis et al. 2004).

A apoptose foi descrita inicialmente pelo australiano John Kerr em 1971 ao observar esta forma de morte celular hepática em ratos. O termo apoptose também foi introduzido por Kerr et al. (1972), usado em grego para descrever o “cair fora” ou “queda” de pétalas de flores, ou folhas de árvores. A apoptose é caracterizada pela ruptura de organelas e do citoesqueleto celular bem como encolhimento e protusões da membrana, condensação e fragmentação da cromatina, e formação de pequenos corpos apoptóticos que serão fagocitados por macrófagos e células vizinhas (Kerr et al. 1972).

O processo de apoptose ocorre em três fases distintas: inicial, efetora e degradativa. O início é induzido por uma variedade de sinais, incluindo danos ao DNA, hipóxia, falta de nutrientes, fatores de crescimento ou hormônios, e ativação de receptores. Duas vias principais de ativação da apoptose têm sido reconhecidas. Um dos mecanismos é mediado pela ativação de receptores transmembrana de fatores de necrose tumoral (TNFs), levando a ativação da caspase-8 ou

10 (via extrínseca). Os outros meios são através da sinalização via celular, induzida por estresse (via intrínseca) e envolvem as mitocôndrias, com liberação do citocromo c e ativação da caspase-9. As caspases, por sua vez, encontram-se naturalmente em forma de pró-enzimas que necessitam de transformação proteolítica para serem ativadas. Alterações da ativação das capsases poderiam influenciar em terapias anti-neoplásicas (Loro et al. 2003)

Entre os reguladores de controle da apoptose encontra-se a proteína p53, produzida pelo gene supressor de tumor de mesmo nome, que possui papel de regulação que envolve inibidores da apoptose como bcl-2, e também pode ter suposto envolvimento no controle da expressão da survivina. Assim, a alta frequência de mutações no gene p53 nas neoplasias malignas pode explicar a superexpressão da survivina nestes casos. Khan et al. (2009) avaliaram a associação entre a expressão da survivina e p53 em 29 casos de CE bucal e 16 lesões com potencial de transformação maligna. A co-expressão ocorreu em 28% dos CE e 18 % das outras lesões. A análise estatística não revelou associação entre co-expressão destes marcadores e tamanho das neoplasias ($p=1$), estágio da lesão ($p=0,65$), envolvimento de linfonodos e metástases ($p=0,38$) e diferenciação da neoplasia maligna ($p=0,38$).

2.4 Survivina

A survivina é uma proteína inibidora da apoptose e reguladora da divisão celular. Componente da família das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) pertencente a classe III deste grupo e também possui atividade importante sobre a angiogênese (O'Connor et al. 2000) devido à sua capacidade de inibir apoptose em células endoteliais e ao aumento de sua expressão quando da exposição a fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Duffy et al. 2007).

A família das IAPs possui efeito regulador sobre a cascata das caspases. As IAPs são os únicos reguladores endógenos conhecidos da atividade tanto das caspases iniciadoras (caspase 9), como das caspases efetoras (caspase 3 e 7). A função das caspases está relacionada à proliferação celular, apoptose e diferenciação celular. Como resultado, as IAPs têm sido avaliadas como potencial alvo terapêutico em uma ampla gama de condições patológicas (Liston et al. 2003). Elas possuem em sua estrutura um domínio denominado baculoviral (BIR), localizado na porção N – terminal podendo ser único, como no caso da survivina, duplos ou triplos, formados por até 70 aminoácidos (Srinvasula et al. 2008).

A survivina foi descrita primeiramente por Ambrosini et al. em 1997 em estudo de carcinomas e linfomas, constatando a proteína em carcinomas de pulmão, pâncreas, cólon e mama. Também

constatarem a expressão da survivina em 50% dos linfomas não-Hodking de alto grau.

A survivina apresenta atividade na fase G2/M do ciclo celular. Ela é componente de um complexo protéico cromossômico temporário, que é essencial para alinhamento do cromossomo durante a mitose e citocinese (Dubrez-Daloz et al. 2008). Durante a fase G2 a survivina concentra-se próxima aos centrômeros, difusa nos braços cromossômicos e no interior dos centrômeros durante a prófase e prometáfase. Na anáfase ela se reposiciona próxima ao fuso e na citocinese ela é encontrada no ponto de união entre as duas células em formação e posteriormente é expulsa durante a separação das células-filhas (Lens et al. 2006; Mita et al. 2008). Como resultado de sua deleção pode ocorrer acúmulo de células multinucleadas poliplóides (Dubrez-Daloz et al. 2008).

Segundo De Maria et al. (2008) existem cinco isoformas de survivina (survivina, survivina-2, survivina-2B, survivina-3B, e survivina-Ex3), que foram avaliadas em 22 pacientes com CE. Os autores verificaram que a isoforma survivina é a mais prevalente em CE ($p = 0,001$), seguida pelas isoformas survivina-Ex3 ($p = 0,001$) e survivina-2B ($p = 0,004$), enquanto a survivina-3B é a de menor prevalência no carcinoma bucal. Segundo Qui et al. (2010) a survivina nuclear é uma subunidade do complexo cromossômico de passagem (CPC) para regulação da divisão celular, enquanto a survivina citoplasmática é cito-protetora interferindo na ação das caspases. Os autores realizaram correlação entre a expressão da survivina, Ki67 e Aurora B (subunidade CPC) em 19 casos de

carcinomas de cabeça e pescoço. Os dois tipos de expressão da survivina estiveram relacionados com carcinomas de cabeça e pescoço pobremente diferenciados, proliferação celular e metástases em linfonodos.

Engels et al. (2007) avaliaram 71 casos de CE bucais e de orofaringe e observaram que a expressão nuclear na survivina foi considerada favorável enquanto a expressão citoplasmática desfavorável. Tonini et al. (2005) investigaram a localização intracelular da survivina em 67 casos de carcinoma pancreático, relacionando a localização nuclear com melhor prognóstico do que a localização citoplasmática.

A expressão da survivina ocorre em tecidos normais apenas em células embrionárias, do timo e epiteliais da camada basal, no entanto sua expressão em neoplasias e tecidos pré-neoplásicos pode estar relacionada ao maior potencial de transformação maligna e prognóstico ruim (Ambrosini et al. 1997; Lo Muzio et al. 2001; Smith et al. 2001; Lo Muzio et al. 2003; Freier et al. 2006). A maior parte dos estudos realizados está limitada apenas ao estágio de progressão da doença, ou seja, quando já existem lesões clinicamente identificáveis, exceto pelo estudo de Lodi et al. (2010) que constataram, através de reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), a presença de RNAm da survivina em 15 espécimes de mucosa bucal normal (gengiva), 17 de leucoplasias e 17 de carcinoma epidermóide bucal. Estes autores verificaram através da atribuição de escores que houve baixa expressão da survivina em 86% dos casos de mucosa normal, alta expressão em 83% de CE,

enquanto a distribuição da expressão das leucoplasias ficou balanceada. Assim, seria oportuno verificar se existe expressão da survivina em pacientes que podem estar em estágio de iniciação para o processo de carcinogênese do CE em boca, mas que ainda não apresentam alterações clínicas visíveis.

A expressão da survivina em casos de carcinoma epidermóide (CE) previamente diagnosticados foi estudada por Lo Muzio et al. (2001), que avaliaram 135 CE, sendo 46 intra-buciais e 89 cutâneos. A expressão foi revelada em 26 casos intra-buciais e 59 em pele, sendo que os tecidos normais adjacentes não apresentaram qualquer tipo de expressão. Os diferentes graus de expressão receberam escores de 1 a 12. Os maiores escores foram vistos nos CE mais indiferenciados e nos casos onde já havia comprometimento de linfonodos. Os mesmos autores realizaram posteriormente em 2003, estudo de 16 casos de tecidos intra-buciais com displasia que evoluíram posteriormente para carcinomas e verificaram a expressão da survivina em 94% dos casos, porém não observaram correlação de tal expressão com o grau de displasia (Lo Muzio et al. 2003). Neste mesmo ano este grupo de pesquisadores avaliaram 110 casos de CE bucais, 6 linfonodos comprometidos e uma única metástase à distância. A survivina foi expressa e em 91 casos (82,7%) dos CE e todos os 07 casos de metástases (100%) (Lo Muzio et al. 2003).

Lesões brancas com displasias epiteliais (DE) e CE foram analisadas por Lin et al. (2005) em pacientes consumidores de *areca*; 97% das DE e 98% dos CE expressaram a survivina. A média

dos casos de transformação maligna das DE em CE foi de (45,6 ± 8,8%) com um aumento da expressão da survivina de DE (32,3 ± 16,3%) para CE (49,4 ± 28,5%), ($p < 0,001$).

Schüssel (2007) verificou a expressão positiva em 42% de casos de queilite actínica e 100% em 12 casos de carcinoma epidermóide em lábio, além de observar correlação com o grau de displasia epitelial. A marcação ocorreu somente no citoplasma e de forma irregular ao longo do epitélio.

Tanaka et al. (2003) verificaram a expressão da survivina em 58% dos CE bucais avaliados e também em 37% das leucoplasias bucais. Também foram avaliados os níveis de RNAm e metilação. Embora os tecidos normais não tenham apresentado expressão do gene survivina, estes alelos encontravam-se metilados, contrastando com os CE sem metilação.

Contrário aos diversos resultados que indicam pior prognóstico aos pacientes com CE com elevados níveis de expressão de survivina, Freier et al. (2006) estudaram o aumento da expressão da survivina em 121 casos de pacientes com CE bucais avançados (67,3%) submetidos à radioterapia, conferindo bom prognóstico por aumento na sobrevida de 3,5-10 anos a estes indivíduos. Também verificaram uma amplificação de 33,9% do gene baculoviral IAP repeat-containing 5 (BIRC5), provável codificador desta proteína. Os autores consideram que a marcação nuclear positiva é sugestiva de bom prognóstico diferentemente da marcação citoplasmática, podendo então ser considerada um fator predictivo independente. Isto ocorreria devido as diferentes isoformas localizadas em diferentes

compartimentos celulares. Outra explicação é que a alta expressão da survivina estaria associada à alta do índice de proliferação, o que tornaria os CE mais susceptíveis ao efeito da radiação.

Jane et al. (2006) avaliaram 38 casos de CE e 17 de leucoplasias, com displasias epiteliais, para expressão da survivina, bcl2, bax e p53. Nenhuma leucoplasia avaliada foi positiva para p53. Para survivina, bcl2, bax houve um aumento da expressão nos CE conforme o grau de malignidade, com maior expressividade para survivina nestes casos ($p < 0,001$).

Kim et al. (2010) avaliaram a expressão da survivina em 38 casos de CE bucais, 06 casos de cultura de células CE, e em modelo experimental de carcinogênese em 20 hamsters. Todos os casos de CE expressaram survivina o que não foi observado em células normais. Foi observada correlação de sua expressão com metástase em linfonodos e proliferação. No modelo experimental, a expressão da survivina foi observada a partir de 8 semanas tornando-se cada vez mais forte com o passar das semanas.

Giovanelli et al. (2002) determinaram a prevalência de papilomavirus humano (HPV) em 61% de 13 casos de CE e 27,1% em 59 lesões com potencial de transformação maligna. Baseado no trabalho de Lo Muzio et al. (2004) decidiram investigar a expressão da survivina associada à presença de HPV e casos de CE e lesões com potencial de transformação maligna, levantando a hipótese de uma possível modulação da apoptose e suas proteínas reguladoras no processo de carcinogênese bucal, como já acontece com oncoproteínas virais E6 que necessitam de interação com produtos do p53 supressor

de tumor. Foi avaliada a presença de HPV em 14 CE, 16 leucoplasias bucais e 20 amostras de mucosa normal. A expressão da survivina foi verificada em 4/7 casos (57,1%) HPV+ e 4/4 casos (100%) HPV – nos casos de CE; para os casos de leucoplasias 6/7 casos (85,7%) HPV+ e 5/9 casos (55,5%) HPV –. Em 2005 Lo Muzio et al. verificaram que a expressão da survivina, Ki-67, PCNA não estaria correlacionada com a infecção pelo vírus HPV em 18 casos confirmados de CE.

Campisi et al. (2005) avaliaram 21 casos de leucoplasias intra-bucais para expressão de PCNA, survivina, bcl-2 e infecção por HPV associando sua expressão à idade, sexo, consumo de cigarros e bebidas alcoólicas através de *Fuzzy system*. A presença de DNA de HPV foi constatada em 8 casos sendo HPV-18 (6 casos) e HPV-16 (2 casos). Os resultados evidenciaram 100% de positividade para PCNA, survivina e consumo de tabaco nos casos de HPV + quando comparado aos HPV-.

Outras neoplasias também têm sido estudadas para expressão da survivina, como no trabalho de Lam et al. (2008), em 51 pacientes com adenocarcinoma colorretal, onde foi encontrado aumento da expressão ($p = 0,01$) comparado ao tecido normal do mesmo paciente. Em estudo de 15 casos de neuroblastomas, Azuhata et al. (2001) constataram que nos 07 casos de recorrência desta neoplasia maligna houve expressão da proteína survivina e em 08 casos de cura da doença houve expressão dos receptores pró-apoptóticos Fas (38%), TRAIL-R1 (75%), TNF –R1 (100%). Zhu et al. (2005) constataram a presença da survivina em 60,5% dos casos de carcinoma hepatocelular e 7,9% dos casos de cirrose hepática, bem

como avaliaram a expressão do VEGF. Dos 23 casos com presença da survivina constatada, 18 expressaram VEGF concomitantemente com maior expressão nos casos com metástases ($p < 0,01$).

A expressão da survivina em doenças crônicas inflamatórias como o líquen plano bucal (LPB) foi verificado por Chaiyarit et al. 2009 em 29 casos, bem como a expressão da *heat shock protein* 90 (Hsp90), proteína de associação molecular que pode causar instabilidade da survivina. A expressão para ambas as proteínas revelou-se reduzida em relação ao grupo controle, constituído por mucosa bucal saudável ($p= 0,001$), e com leve preferência para localização nuclear de survivina nos casos de LPB. A hipótese dos autores considera a possibilidade de influência do p53 na inibição da survivina.

Os diversos estágios da carcinogênese induzida quimicamente de 4-nitroquinilona 1-óxido (4-NQO) em língua de ratos, foram objeto de estudo de Kitakawa (2006) e Ribeiro et al. (2007) em 30 ratos tipo Wistar, com avaliações após início da aplicação de 4-NQO durante 4, 12 e 20 semanas. Nas lesões com potencial de transformação maligna observou a expressão da survivina após 12 semanas e também esteve aumentada comparada ao controle negativo ($p < 0,05$). A carcinogênese em modelos experimentais também foi objeto de estudo de Hsue et al. (2008) induzida pelo 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) na mucosa jugal de 50 hamsters. A survivina pôde ser observada após três semanas na camada epitelial em alguns hamsters, e após sete semanas em todos os animais.

Faz-se, portanto, necessário estudo desde o processo de iniciação, promoção até o carcinoma propriamente em material humano, para o estabelecimento do perfil evolutivo de expressão da survivina.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve como proposição verificar a correlação clinicopatológica da expressão da survivina nas diferentes condições relacionadas à carcinogênese intra-bucal humana. As condições estudadas para tanto foram mucosa bucal de bordo lingual e assoalho bucal, sob a forma de esfregaços, leucoplasias bucais com diferentes graus de displasia epitelial e carcinomas epidermóides intra-bucal, estes dois últimos sob a forma de biópsias, procurando estabelecer um perfil evolutivo do carcinoma bucal paralelamente à expressão da survivina.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Seleção das amostras

Foram constituídos três grupos formados em parte por material citológico coletado de pacientes participantes do Programa Ambulatorial de Tratamento de Tabagismo do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (INCOR-HCFMUSP); e por material que se encontrava incluído em blocos de parafina no Laboratório de Patologia Bucal da FOSJC-UNESP. Desta forma os grupos ficaram divididos em:

- a) Grupo 1: Constituído por material citológico coletado do bordo lateral esquerdo da língua e assoalho bucal de 30 pacientes fumantes que fumem mais de 20 cigarros/dia há mais de 10 anos, de ambos os sexos, que não apresentavam histórico de neoplasia bucal maligna, nem sinais clínicos visíveis de qualquer alteração no local avaliado.
- b) Grupo 2: Constituído por 21 amostras teciduais, obtidas a partir de biópsias de lesões brancas classificadas clinicamente como

leucoplasias, com diagnóstico histopatológico de diferentes graus de displasia epitelial.

- c) Grupo 3: Constituído por 42 amostras teciduais, obtidas a partir de biópsias de CE bucal, localizados em língua e assoalho bucal.

Após serem esclarecidos sobre a proposição e condições deste trabalho, aqueles que aceitaram participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Este trabalho foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FOSJC-UNESP CEP n 026/2008-PH/CEP (Anexo A, B e C) e pela CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o protocolo 1362/09 apresentado pela Comissão Científica do INCOR (Anexo D).

Todos os pacientes do grupo I foram submetidos a exame clínico intra e extra-bucal, responderam a um questionário sob forma de entrevista onde foram indagados sob frequência e quantidade consumida de cigarros. Os dados obtidos foram anotados em uma ficha de coleta (Apêndice).

As amostras teciduais de lesões classificadas clinicamente como leucoplasias foram submetidas à reclassificação segundo a proposta da Organização Mundial de Saúde (OMS) 2005, para padronização dos diagnósticos.

4.2 Processamento das amostras teciduais

As peças foram processadas no Laboratório de Patologia – FOSJC/UNESP onde se encontravam incluídas em parafina. Foram realizados cortes com espessura de 3µm a partir dos blocos selecionados para tratamento imunoistoquímico e cortes com espessura 5µm para coloração de rotina (hematoxilina-eosina).

4.3 Padronização das amostras teciduais de leucoplasias bucais

O grau de displasia epitelial das leucoplasias foi baseado nos critérios da OMS (Barnes 2005), conforme descrito abaixo:

- a) Displasia epitelial leve: as atipias e anormalidades estruturais estão restritas ao terço inferior do epitélio, acompanhadas de poucas atipias celulares.
- b) Displasia epitelial moderada: as atipias e anormalidades estruturais estão restritas ao terço médio do epitélio. Deve ser levado em consideração o grau de atipia citológica. A presença de grande atipia celular pode indicar uma lesão que deve ser classificada como

displasia severa apesar de nenhuma extensão para o terço superior do epitélio.

- c) Displasia severa (ou intensa): mais de dois terços do epitélio exibem atipias celulares e estruturais.

O quadro 1 relaciona as alterações na estrutura e nas células individualmente.

Quadro 1 - Critérios para diagnóstico de displasias.

Arquitetura	Citologia
Estratificação irregular do epitélio	Variação anormal do tamanho nuclear
Perda da polaridade das células basais Hiperplasia das células basais	Pleomorfismo nuclear
Projeções epiteliais em forma de gota	Variação anormal do tamanho celular
Aumento do número de figuras mitóticas	Pleomorfismo celular
Mitoses em camadas superficiais	Perda da relação núcleo-citoplasma
Ceratinização individual	Aumento do tamanho nuclear
Formação de pérolas córneas dentro das projeções epiteliais	Figuras de mitose atípicas Aumento do número e tamanho de nucléolos Hiperchromasia

Fonte: Barnes, 2005.

Para maior precisão da identificação dos terços epiteliais foi utilizada uma lente ocular milimetrada Carl Zeiss® E-PI 100/200x.

Os casos de carcinoma epidermóide não foram graduados histologicamente, pois as amostras foram obtidas de biópsias incisionais, não representativas da verdadeira gradação da lesão.

4.4 Realização da citologia esfoliativa e fixação das amostras

A citologia esfoliativa foi realizada utilizando-se o *cytobrush* na coleta de material do bordo lateral esquerdo da língua e assoalho bucal dos pacientes selecionados, sem a utilização prévia de enxaguatórios bucais (Fontes et al. 2008; Mc Cullough e Farah 2008). Foram confeccionados 2 esfregaços de cada região em lâminas silanizadas que foram então imersas em um *container* com álcool absoluto (Suthipintawong et al. 1996) e fixadas pelo mínimo de 2 horas. As amostras foram levadas para os laboratórios de imunohistoquímica e processamento tecidual da Disciplina de Patologia da FOSJC – UNESP. Uma lâmina de cada local selecionado foi processada pela técnica de imunohistoquímica com o anticorpo primário anti-survivina e para coloração de Papanicolaou.

4.5 Realização da imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram realizadas pelo método avidina-biotina, na coloração dos complexos antígeno/anticorpo pela imunoperoxidase. O anticorpo e a diluição utilizados estão descritos no quadro 2.

Quadro 2 - Anticorpo policlonal para survivina.

Nome do anticorpo	Diluição	Reatividade
Clone SC-10811 (Santa Cruz Biotechnology)	1:100	Survivina

O material tecidual obtido a partir dos blocos foram desparafinados em xilol e reidratados em série descendente de etanóis terminando o processo com imersão em hidróxido de amônia por 10 min. O material citológico não passou por este processo.

Após lavagem com água deionizada todas as lâminas foram submetidas ao tratamento:

- a) imersão em solução de ácido cítrico monoidratado 10mM-pH6.0, no forno de microondas em 3 ciclos de 5 min cada com potência 650W e resfriamento de 20 min;
- b) lavagem com 2 banhos de água deionizada;

- c) bloqueio da peroxidase endógena com solução 1:1 de metanol e água oxigenada em 2 banhos de 5 min cada;
- d) lavagem com 2 banhos de água deionizada 5 min;
- e) duas incubações em solução de TRIS-pH 7.4, por 5 min cada;
- f) incubação em *Bovine serum albumin* (BSA) durante 1 hora em cubas umidificadoras;
- g) aplicação do anticorpo primário *overnight* a 4°C em cuba umidificadora. Para evitar o desperdício do anticorpo diluído nas lâminas de material citológico e garantir seu contato com as células durante todo o período de incubação, foi delimitado com a caneta *pap pen* uma área de aproximadamente 1,5cm na região central da lâmina de microscopia;
- h) duas lavagens em TRIS-pH 7.4, por 5 min cada;
- i) aplicação do anticorpo secundário (Kit LSAB[®], System-HRP K0690/DAKO - Biogen-BR), durante 30 min, em cuba umidificadora a temperatura ambiente;
- j) duas lavagens em TRIS-pH 7.4, por 5 min cada;
- k) aplicação do complexo terciário (Kit LSAB[®], System-HRP K0690/DAKO - Biogen-BR) em

cuba umidificadora 30 min a temperatura ambiente;

- l) duas lavagens em TRIS-pH 7.4, por 5 min cada;
- m) aplicação de diaminobenzidina (DAB) por 30 min em cuba umidificadora a temperatura ambiente;
- n) duas lavagens em TRIS-pH 7.4, por 5 min cada;
- o) dois banhos de água destilada, 5 min cada;
- p) hematoxilina de Mayer por 2 min, seguida pela lavagem em água corrente e passagem no diferenciador;
- q) três banhos de água destilada, por 5 min cada;
- r) desidratação em séries ascendente de etanóis e xilol;
- s) montagem das lâminas com Permaunt[®].

O controle positivo de todas as reações foi realizado nos próprios cortes de CE. Para realização do controle negativo algumas lâminas foram processadas normalmente, porém sem a aplicação do anticorpo primário.

4.6 Realização da Técnica de Papanicolaou

O material citológico obtido dos pacientes foi submetido à coloração de Papanicolaou e Traut (1941), conforme descrição abaixo:

- a) lavagem das lâminas por 2x em água destilada;
- b) diferenciador - 2 banhos;
- c) desidratação - 2 banhos;
- d) imersão no reagente Orange-6/ SIGMA[®], durante 5min;
- e) lavagem das lâminas por 2x com álcool absoluto;
- f) imersão no reagente EA-50/ SIGMA[®], durante 5 min;
- g) lavagem das lâminas 2x com álcool absoluto;
- h) lavagem das lâminas mais 2x com álcool absoluto;
- i) lavagem das lâminas mais 2x com álcool absoluto;
- j) realizar 3 banhos consecutivos com xilol I, xilol II e xilol montagem;
- k) montagem das lâminas com Entelan[®].

4.7 Avaliação do material citológico

A avaliação das lâminas processadas pela técnica de imunohistoquímica foi realizada através da microscopia óptica em aumento 400x, tendo como critério a marcação, ou não, observada através da coloração “marrom” das células coletadas.

Através de uma análise qualitativa os esfregaços foram classificados dentro de uma escala de quatro pontos em uma área de 1,5 cm de diâmetro, previamente delimitada:

0 = nenhuma célula positiva;

1 = 25% das células positivas;

2 = 50% das células positivas;

3 = 75% das células positivas;

4 = 100% das células positivas.

A análise do material além da positividade ou não, incluiu a localização intra-celular: nuclear, citoplasmática ou nuclear/citoplasmática. A intensidade da marcação nas células foi classificada em:

0 = marcação negativa;

1 = marcação fraca;

2 = marcação moderada;

3 = marcação forte.

Seguindo os critérios de Lo Muzio et al. (2001) e Lo Muzio et al. (2003), os escores obtidos pela avaliação qualitativa (0,1,2,3,4) e os escores obtidos pela avaliação de intensidade de

marcação das células (0,1,2,3) foram multiplicados e tiveram como resultados os escores finais: 2, 3, 4, 6, e 9.

A análise dos esfregaços foi realizada de acordo com os parâmetros definidos por Papanicolaou e Traut (1941) (Quadro 3).

Quadro 3 - Critérios utilizados para classificação dos esfregaços.

Classes	Descrição
0	Material insuficiente ou inadequado para análise.
I	Esfregaço normal.
II	Esfregaço normal com alterações inflamatórias.
III	Atipias, esfregaço suspeito.
IV	Fortemente indicativa, mas não conclusiva de malignidade.
V	Citologia conclusiva de malignidade.

Foi realizada uma análise qualitativa, em microscopia comum aumento 200x e 400x, dos seguintes componentes celulares dos esfregaços corados pela técnica de Papanicolaou:

- a) célula superficial com núcleo;
- b) célula superficial sem núcleo;
- c) célula intermediária;
- d) célula basal;
- e) infiltrado inflamatório;
- f) alterações inflamatórias (halo perinuclear, vacuolização, alteração de cor);

- g) hemácias;
- h) muco
- i) colônias bacterianas;
- j) grânulos de querato-hialina;
- k) atipias celulares.

O critério para avaliação da quantidade destes elementos em toda a extensão dos esfregaços foi:

- 0= ausência;
- 1= presença em pouca quantidade (até 25%);
- 2= presença em média quantidade (entre 25- 50%);
- 3= presença em quantidade abundante (mais de 50%).

4.8 Avaliação do material histopatológico

Foi realizada análise qualitativa do material histopatológico de displasias epiteliais e carcinomas intra- bucais através de análise por microscopia comum realizada com aumento 400x. Os escores atribuídos a cada lâmina foram os mesmos utilizados por Jane et al. (2006):

- 0= negativo, menos de 5% de células positivas;
- 1= marcação de intensidade fraca, entre 5-25% de células positivas;

2= marcação de intensidade moderada, entre 25-50% de células positivas;

3= marcação forte, mais de 50% de células positivas.

4.9 Análise estatística

Foi realizada análise descritiva dos dados obtidos, teste de Mann-Whitney, bem como aplicação do teste exato de Fisher e X^2 para identificação de associação entre as variáveis analisadas.

5 RESULTADOS

5.1 Perfil dos tabagistas

Foram avaliados 30 participantes do Programa Ambulatorial de Tratamento de Tabagismo do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (INCOR-HCFMUSP) sendo 13 do sexo feminino e 17 do sexo masculino. A média de idade foi de 54 anos (mínimo-máximo: 36-74 anos).

O tempo de consumo de cigarros foi de 34,5 anos (mínimo-máximo: 11-65 anos), com média de 20 cigarros/dia (mínimo-máximo: 20-60). O consumo de álcool foi relatado por apenas 19 indivíduos, sendo a frequência diária em 7 casos e mensal em 12 casos com ingestão média de 6 doses de bebida alcoólica por ocasião. Quando ingeriam bebidas alcoólicas os pacientes relataram aumento do número de cigarros consumidos de em média 10 cigarros com filtro a mais do que o consumo diário.

Três tipos de bebidas alcoólicas eram ingeridas: vinho, cachaça e cerveja, que foram agrupados em bebidas destiladas e bebidas fermentadas. A cerveja foi o tipo de bebida mais consumida.

Nenhum paciente relatou consumir drogas ilícitas.

Devido às diversas doenças, os pacientes faziam uso diário de medicamentos principalmente anti-hipertensivo (27 casos), redutor de colesterol (18 casos), anti-coagulante (10 casos), anti-depressivo (09 casos), hipoglicemiante oral (07 casos), hormônio da tireóide (02 casos), anti-convulsivante (01 caso), insulina (01 caso), e bronco-dilatador (01 caso) e antiarrítmico (01 caso).

5.2 Expressão da survivina x consumo de cigarros

A expressão da survivina ocorreu em todos os 30 pacientes avaliados e em todos os casos só foi encontrada marcação citoplasmática.

Os pacientes foram divididos em 5 grupos segundo o número de cigarros consumidos por dia: 20-29 cigarros; 30-39 cigarros, 40-49 cigarros, 50-59 cigarros e 60 cigarros. A expressão da survivina encontrada no bordo lingual e assoalho bucal, segundo o consumo diário de cigarros, estão ilustradas na Figura 1.

Através do teste exato de Fisher não foi observada associação entre os escores de expressão da survivina e o consumo diário de cigarros para localização em língua ($p= 0,68$) e assoalho bucal ($p= 0,69$).

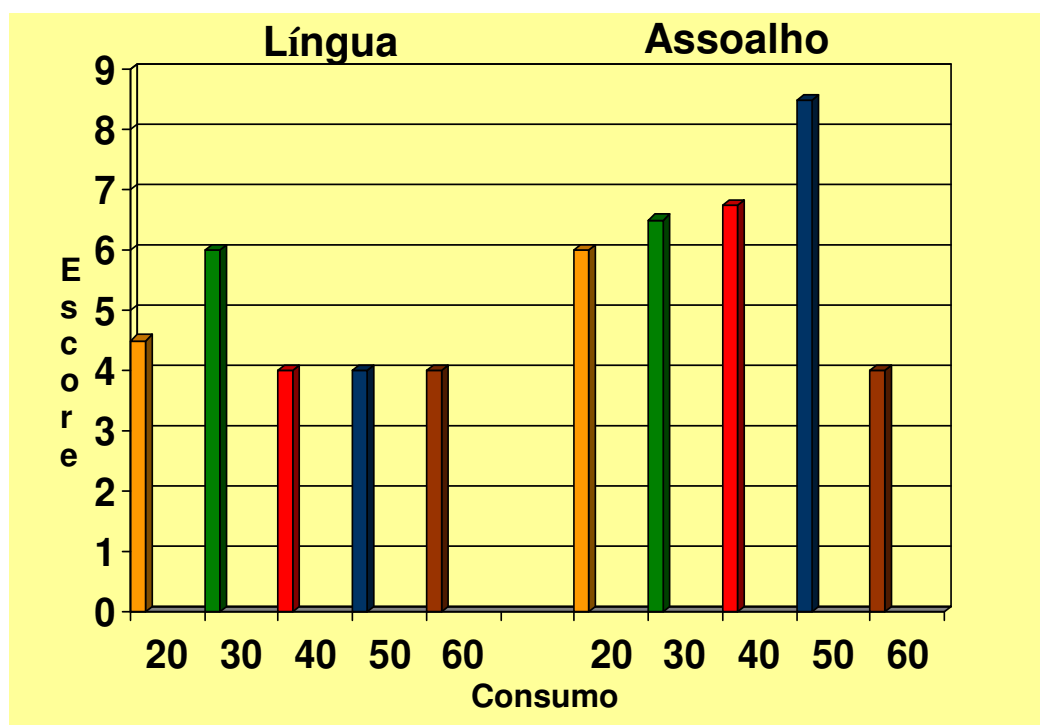


Figura 1 - Gráfico da expressão da survivina segundo o consumo diário de cigarros.

O mesmo teste não indicou associação entre a quantidade de expressão de survivina e o tempo de tabagismo. Para esta associação o grupo foi dividido segundo a mediana 34,5 anos. Os dados podem ser observados nas tabelas 1 e 2.

A expressão da survivina foi maior nos casos de assoalho bucal quando comparada ao bordo lingual pelo teste de Mann-Whitney ($p= 0,001$).

Tabela 1 - Expressão da survivina em esfregaços citológicos do bordo lingual segundo o tempo de tabagismo.

Escore/ Tempo tabagismo	2	3	4	6	9	Total
Igual ou inferior a 34,5 anos	2	0	7	4	2	15
Superior a 34,5 anos	2	1	10	1	1	15
Total	4	3	17	5	3	30

Teste exato de Fisher = 0,21 > 0,05.

Tabela 2 - Expressão da survivina em esfregaços citológicos do assoalho bucal segundo o tempo de tabagismo.

Escore/ Tempo tabagismo	2	3	4	6	9	Total
Igual ou inferior a 34,5 anos	1	0	3	5	6	15
Superior a 34,5 anos	0	0	6	3	6	15
Total	1	0	9	8	12	30

Teste exato de Fisher = 0,69 > 0,05.

5.3 Expressão da survivina x ingestão de bebidas

A ingestão de bebidas alcoólicas foi associada à maior quantidade de células positivas para survivina em assoalho bucal o

que não aconteceu no bordo lingual, embora não significativa segundo o teste exato de Fisher conforme a tabela 3.

Tabela 3 - Expressão da survivina em esfregaços citológicos em distribuição de frequência relativa (%) de 19 pacientes etilistas.

Escore	Língua (%)	Assoalho(%)
2	10,5	5,2
3	0	0
4	57,9	26,3
6	26,3	26,3
9	5,2	42,1
Total	100	100

Teste exato de Fisher: língua $p= 0,67 > 0,05$; assoalho $p= 1,0 > 0,05$.

5.4 Expressão da survivina x idade e sexo

A faixa etária foi dividida segundo a mediana: 54 anos de idade e a tabela 4 mostra a relação com a expressão da survivina.

Tabela 4 - Expressão da survivina em esfregaços citológicos segundo as diferentes faixas etárias.

Acima ou igual a 54						
Escore / Localização	2	3	4	6	9	Total
Língua	2	0	11	1	1	15
Assoalho	0	0	6	2	7	15
Abaixo de 54						
Escore / Localização	2	3	4	6	9	Total
Língua	2	1	6	4	2	15
Assoalho	1	0	3	6	5	15

A expressão da survivina foi avaliada nos 17 homens e 13 mulheres fumantes, conforme figura 2.

Através do teste de Mann-Whitney não foram observadas diferenças entre a expressão da survivina entre o sexo masculino e feminino para assoalho bucal ($p= 0,65$), porém para localização em bordo lingual foi quase significativa ($p= 0,059$). O mesmo teste não apontou diferenças entre as idades e localizações avaliadas: assoalho ($p= 0,87$) e língua ($p= 0,38$).

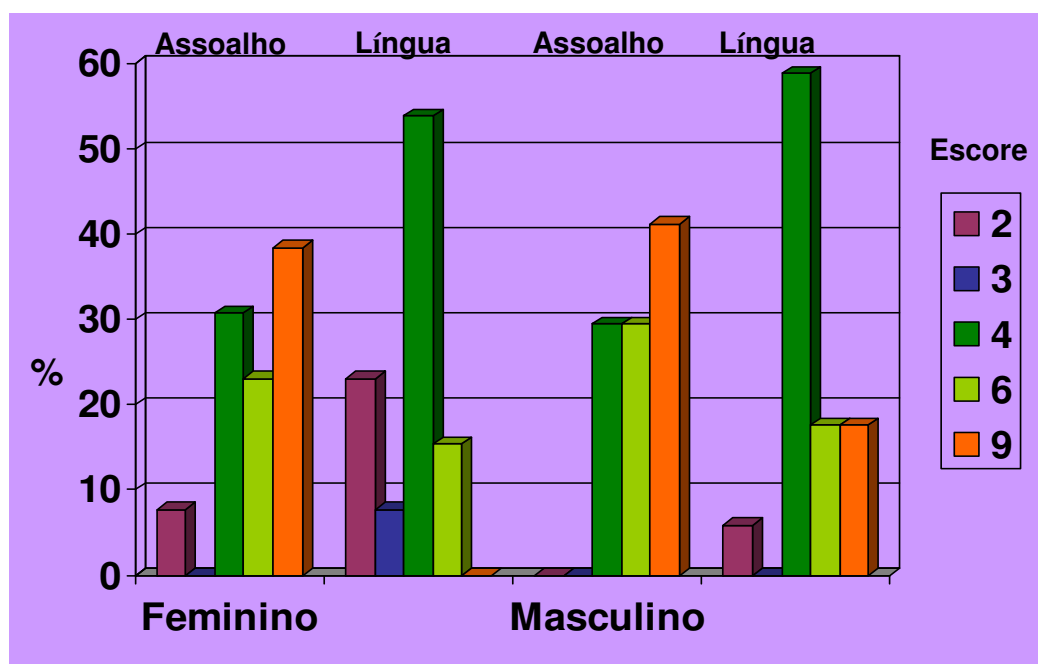


Figura 2 - Gráfico da expressão da survivina nos esfregaços citológicos de pacientes do sexo masculino e feminino segundo o número total de casos avaliados (30), escore e localização intra-bucal.

5.5 Análise de Papanicolaou

A análise das lâminas coradas pela técnica de Papanicolaou permitiu a classificação dos esfregaços dos 30 fumantes em classe I e II (Tabela 5). A avaliação dos elementos celulares e componentes presentes nos raspados bem como sua quantidade estão descritos nas tabelas 6 e 7. Células basais e hemácias não foram observadas.

Tabela 5 - Número de casos classificados como classe I e classe II.

Classe	Localização		
	Língua (n)	Assoalho (n)	Total
Classe I	9	10	19
Classe II	21	20	41
Total	30	30	60

Tabela 6 - Componentes dos esfregaços citológicos em assoalho bucal.

Componentes	Escore				Total
	0	1	2	3	
Célula superficial com núcleo	0	9	14	7	30
Célula superficial sem núcleo	23	7	0	0	30
Célula intermediária	0	0	11	19	30
Infiltrado inflamatório	10	17	3	0	30
Descoloração	9	18	3	0	30
Halo perinuclear	19	8	3	0	30
Muco	1	13	11	5	30
Colônias bacterianas	11	18	1	0	30
Grânulos de queratina	4	13	13	0	30
Atipia celular	30	0	0	0	30

Foi encontrada uma única célula binucleada em 1 esfregaço de assoalho bucal e 3 células binucleadas em outra lâmina deste mesmo grupo.

Tabela 7 - Componentes dos esfregaços citológicos em bordo lingual.

Componentes	Escore				Total
	0	1	2	3	
Célula superficial com núcleo	0	1	20	9	30
Célula superficial sem núcleo	26	4	0	0	30
Célula intermediária	0	1	14	15	30
Infiltrado inflamatório	9	13	7	1	30
Descoloração	4	19	6	1	30
Halo perinuclear	16	9	5	0	30
Muco	0	13	15	2	30
Colônias bacterianas	9	19	2	0	30
Grânulos de queratina	2	13	15	0	30
Atipia celular	30	0	0	0	30

Foram encontradas 3 células binucleadas em 3 lâminas distintas coletadas do bordo lingual.

5.6 Leucoplasias bucais

Este grupo foi constituído por tecido intra-bucal obtido através do procedimento de biópsia em 11 homens e 10 mulheres com idade média de 56 anos (mínimo-máximo: 33-81 anos).

A expressão da survivina ocorreu em 85,7% dos 21 casos avaliados, com expressão exclusiva no citoplasma em 18 casos e simultânea do núcleo e citoplasma em apenas 3 casos.

As localizações intra-bucais avaliadas bem como sua expressão para survivina encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 - Expressão histológica da survivina em leucoplasias bucais em diferentes locais anatómicos.

Localização	Escore				Total
	0	1	2	3	
Assoalho	1	1	0	0	2
Gengiva	1	0	0	1	2
Língua	1	1	2	1	5
Mucosa Jugal	3	1	1	3	8
Rebordo alveolar	0	2	1	1	4

A avaliação da expressão nas diferentes camadas do epitélio (basal, espinhosa e superficial) pode ser observada na Figura 3.

Na camada superficial do epitélio a distribuição da expressão da survivina ocorreu de forma homogênea: escore 1 (23,81%), escore 2 (23,81%) e escore 3 (23,81%). Nas outras camadas

a maior expressão foi para o escore 3: camada basal (23,81%) e camada espinhosa (28,57%).

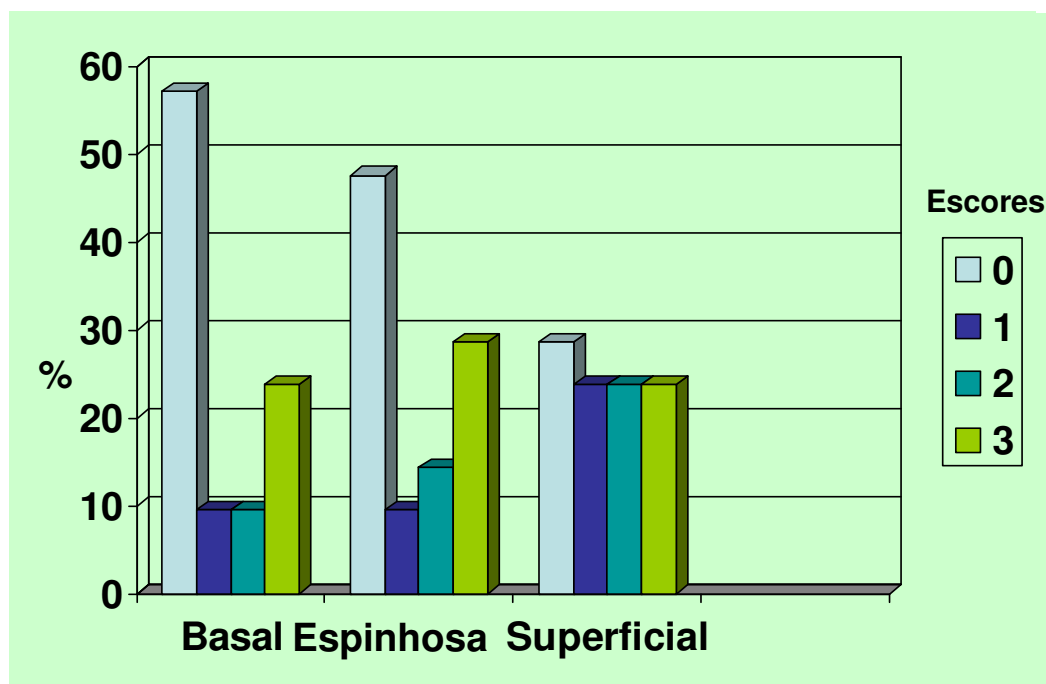


Figura 3 - Gráfico da expressão histológica da survivina em leucoplasias bucais em diferentes camadas epiteliais.

Quanto ao grau de displasia epitelial, segundo os critérios da OMS: 6 casos foram classificados como leve, 8 moderados e 7 intensas. O teste exato de Fisher não mostrou associação entre o grau de displasia epitelial leve ($p=0,63$); moderada ($p=0,08$) ou intensa ($p=0,36$) e os diferentes graus de expressão de survivina (Tabela 9).

Não foi observada associação entre a expressão da survivina e a idade ($p= 1$) e sexo ($p= 0,67$) segundo o teste exato de Fisher. O teste de Mann-Whitney também não revelou diferença na expressão da survivina entre diferentes idades ($p= 0,59$) e entre o sexo

masculino e feminino ($p= 0,97$). Devido à diversidade de localizações das leucoplasias não foi possível realizar testes de associação ou comparação.

Tabela 9 - Expressão da survivina em diferentes graus de displasia epitelial.

Grau de displasia	Escore				Total
	0	1	2	3	
Leve	0	2	2	2	6
Moderada	5	1	1	1	8
Intensa	1	1	1	4	7
Total	6	4	4	7	21

5.7 Carcinomas epidermóides bucais

Este grupo também foi constituído por tecido obtido através do procedimento de biópsia em tecidos intra-bucais de 33 homens e 9 mulheres com mediana de 58 anos de idade (mínimo-máximo: 43-92 anos). O material foi composto de 22 amostras teciduais da língua e 20 de assoalho bucal.

A proteína survivina foi encontrada em 83,3% dos 42 casos avaliados. Destes, 36 apresentaram somente expressão citoplasmática enquanto os outros 6 casos tiveram expressão simultânea no núcleo e citoplasma. Os 6 casos de expressão nuclear ocorreram em assoalho bucal.

A expressão da survivina em ambas as localizações pode ser observada na Figura 4.

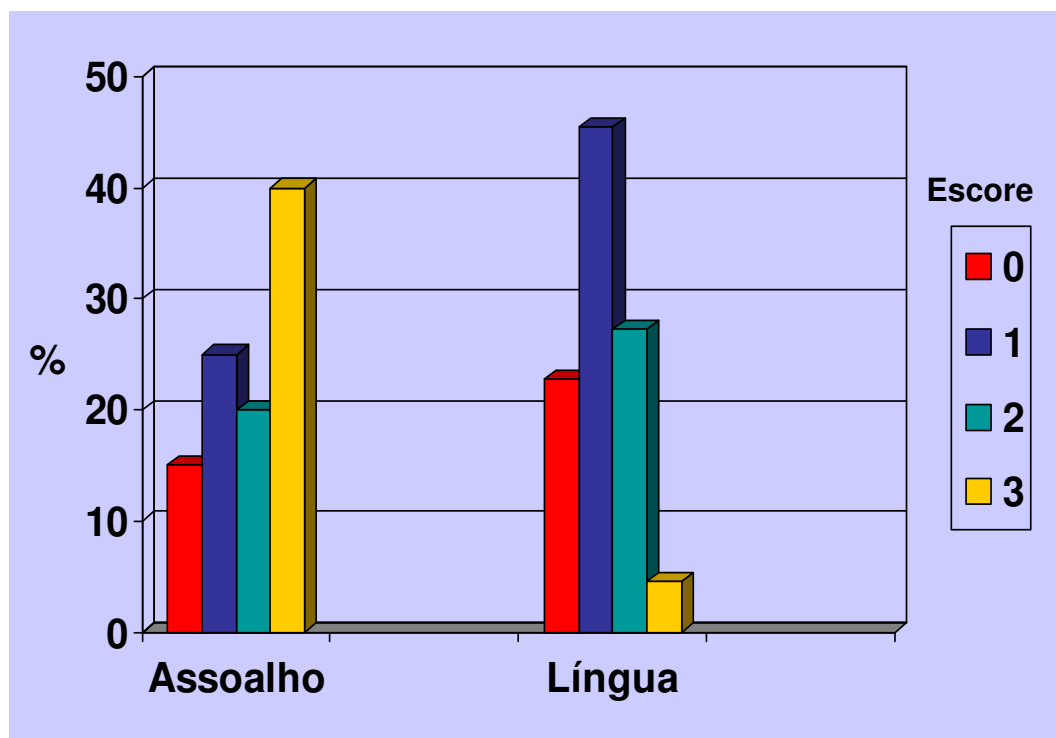


Figura 4 - Gráfico da expressão da survivina em carcinomas epidermóides bucais.

Através do teste de X^2 foi observada associação entre a localização e a expressão da survivina ($X^2= 7,9$; $gl= 3$; $p= 0,04$). Houve maior expressão da survivina nos casos de assoalho bucal quando comparados a língua pelo teste de Mann-Whitney ($p= 0,03$).

A associação sexo e expressão da survivina também não foram significativas ($X^2= 2,02$; $gl= 3$; $p= 0,56$) e a comparação entre os sexos masculino e feminino através do teste de Mann-Whitney não revelou diferenças ($p= 0,38$).

Não foi obtida associação entre a expressão da survivina pelo teste X^2 ($X^2= 3,77$; $gl= 3$; $p= 0,28$). A comparação entre

os diferentes grupos etários também não foi expressiva pela avaliação de Mann-Whitney ($p= 0,76$).

As figuras a seguir ilustram a expressão da survivina nas células da mucosa bucal de tabagistas (Figura 5); nos casos de leucoplasias (Figuras 6) e carcinomas epidermóides intra-bucais (Figuras 7). A foto 8 exhibe os resultados celulares observados pelo método de estudo de Papanicolaou.

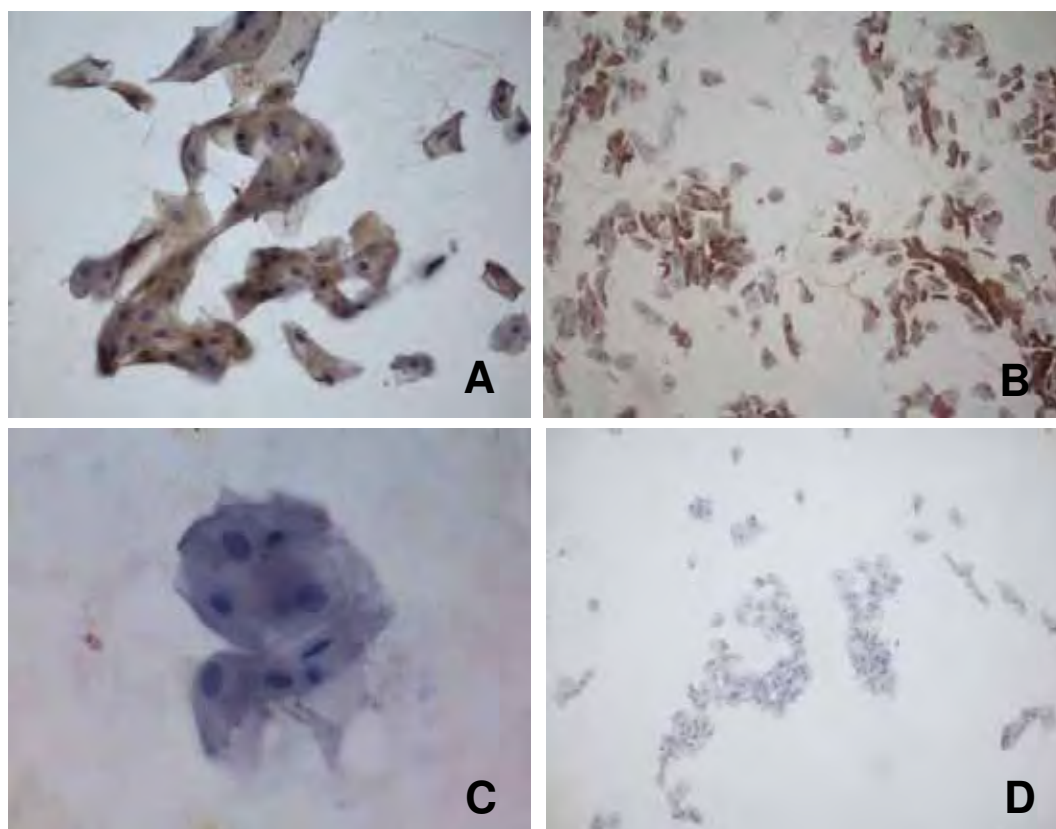


Figura 5 - Expressão da survivina na citologia de indivíduos tabagistas. A: Células com citoplasma positivo e núcleo negativo (aumento 400x); B: Esfregaço misto contendo células positivas e negativas (aumento 200x); C: Células negativas agrupadas (aumento 1000x); D: Esfregaço com todas as células negativas (aumento 200x).

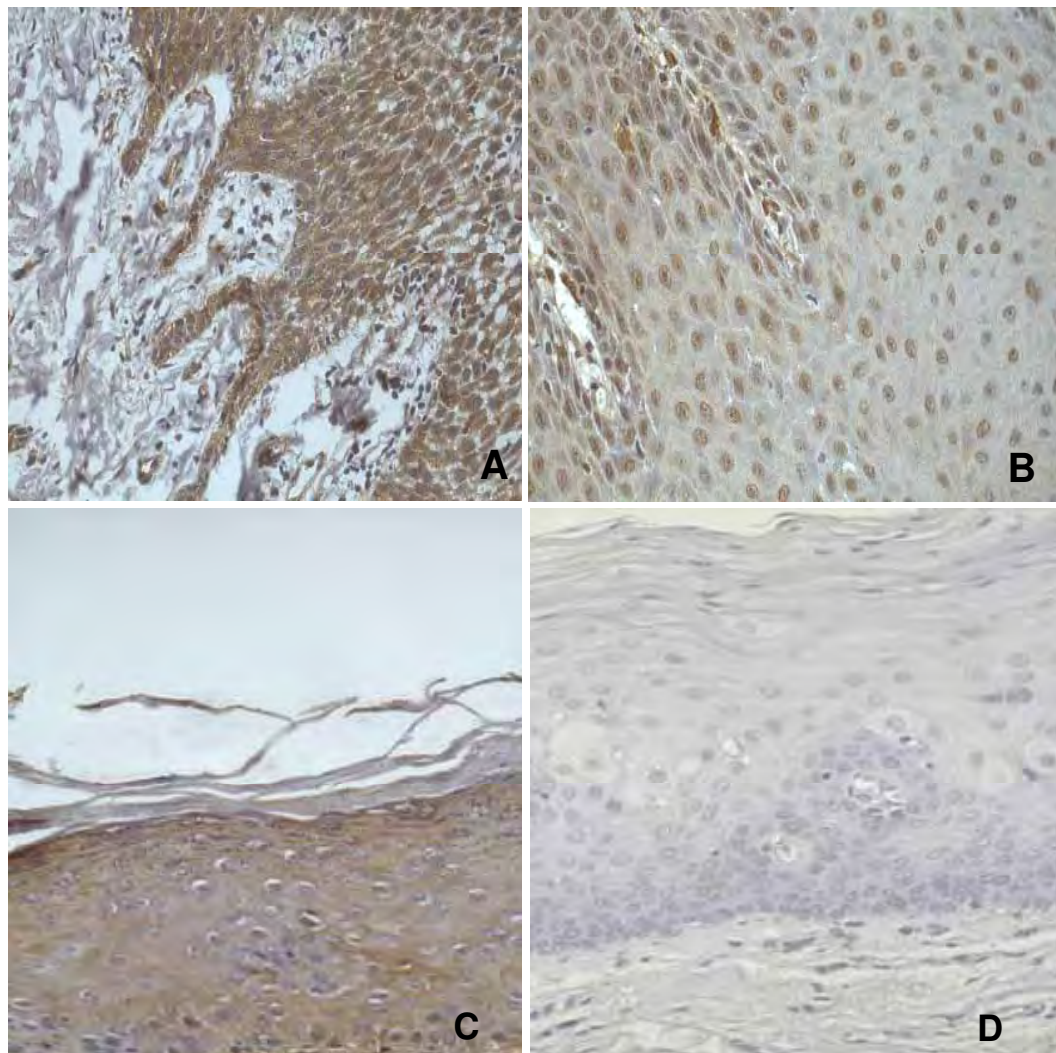


Figura 6 - Expressão da survivina em leucoplasias intra-buciais. A: Marcação positiva citoplasmática para survivina (aumento 200x). B: Marcação nuclear positiva para survivina (aumento 400x). C: Marcação positiva citoplasmática para survivina nas camadas superficiais do epitélio (aumento 400x). D: Controle negativo dos casos (aumento 400x).

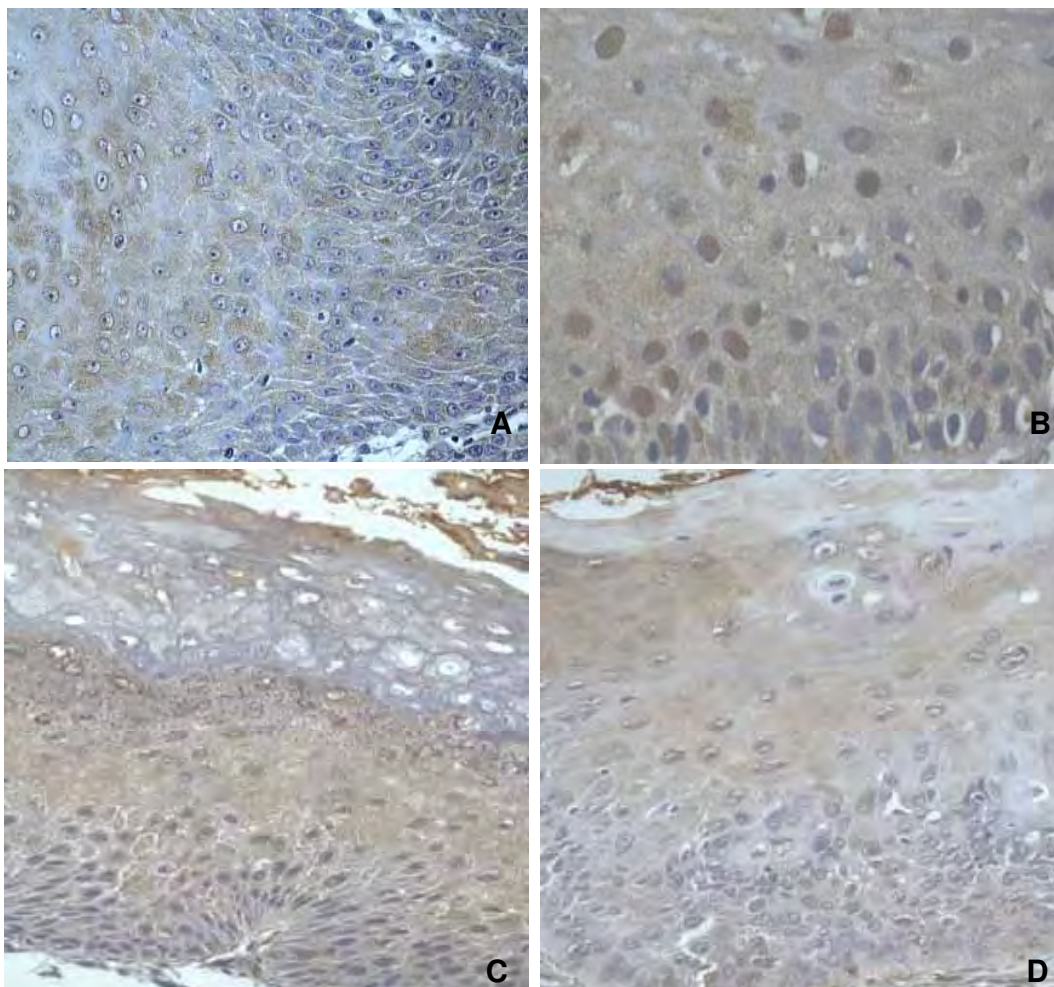


Figura 7 - Expressão da survivina em carcinomas epidermóides intra-bucais. A: Marcação positiva citoplasmática para survivina (aumento 200x). B: Marcação mista núcleo-citoplasma positiva e negativa (aumento 1000x). C e D: Marcação positiva para survivina no citoplasma e núcleo (aumento 400x).

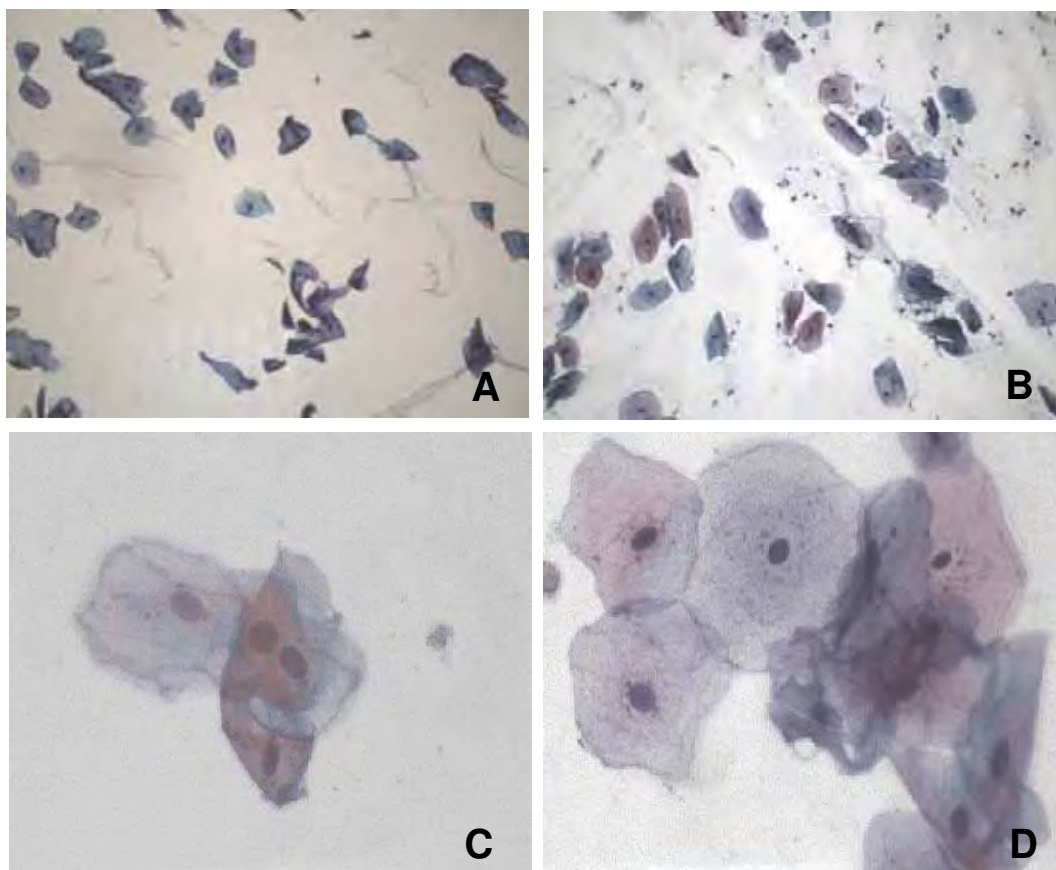


Figura 8 - Células da mucosa de indivíduos fumantes coradas e analisadas pelo método de Papanicolaou. A: classe I de Papanicolaou (aumento 100x). B: classe II de Papanicolaou (aumento 100x). C: Células apresentando descoloração citoplasmática (aumento 1000x). D: Células apresentando grânulos de querato-hialina, halo perinuclear e descoloração (aumento 1000x).

6 DISCUSSÃO

A expressão da survivina é considerada um marcador predictivo em casos de carcinomas e lesões com potencial de transformação maligna (Freier et al. 2006; Kim et al. 2010; Lo Muzio et al. 2003; Lo Muzio et al. 2003).

A expressão da survivina em tecidos adultos diferenciados e sem alterações não é usualmente encontrada, no entanto Lodi et al. (2010) constataram a presença de RNAm desta proteína em gengiva saudável. Kitakawa (2006) também observou a presença da survivina nas camadas granulosa e córnea do epitélio da língua de ratos tipo *Wistar*, em carcinogênese experimental após 4 semanas de administração de 4NQO. Mesmo sem alterações clínicas e microscópicas a survivina foi observada, evidenciando sua importância na fase inicial da carcinogênese.

Neste estudo, além do CE bucal e dos tecidos displásicos também foi avaliado material celular da mucosa clinicamente saudável de tabagistas crônicos, possivelmente em estágio de iniciação à carcinogênese. Todos os esfregaços citológicos provenientes destes fumantes expressaram survivina, porém não foi observada correlação entre a expressão da survivina em bordo lingual e assoalho bucal e o consumo diário de cigarros ($p= 0,68$ e $0,69$) bem como para o tempo de tabagismo ($p= 0,21$ e $0,69$).

A mucosa bucal de fumantes tem sido objeto de muitos estudos que, através de diferentes métodos avaliam a maturação celular (Pavanello et al. 2006); proliferação celular (Fontes et al. 2008) e erros de duplicação do material genético (Lima 2007). Isto porque o cigarro é reconhecidamente um agente iniciador do processo de carcinogênese intra-bucal.

Não foi encontrado na literatura até o momento pesquisas que associem a expressão da survivina e o tabagismo em mucosa bucal sem alterações clinicamente detectáveis, estando restritas ao tabagismo associado a lesões displásicas e aos carcinomas. Lin et al. (2005) em avaliação da ação do tabaco em displasias epiteliais constataram 24 casos de expressão da survivina em até 50% do epitélio, e 19 casos de CE bucal em até 100%. Lo Muzio et al. (2001) verificaram a associação tabaco e survivina em 55% dos casos avaliados de CE bucal. Lodi et al. (2010) observaram que em pacientes fumantes com leucoplasias bucais houve alta expressão da survivina ($p= 0,0049$).

As duas localizações intra-bucais avaliadas, língua e assoalho bucal, são sítios de risco para o desenvolvimento de CE bucal (Tommasi 2002; Fontes 2008). A comparação entre elas revelou diferença significativa com maior expressão da survivina em assoalho bucal ($p= 0,001$). Este fato pode estar relacionado à ação conjunta de outros carcinógenos no assoalho bucal, como bebida alcoólica, que anatomicamente favorece seu represamento aumentando o tempo de contato com a mucosa.

O número de cigarros consumidos por dia não teve influência sobre os resultados para survivina em língua ($p= 0,68$) e assoalho bucal ($p= 0,69$), bem como o tempo de tabagismo (língua $p= 0,21$; assoalho bucal $p= 0,69$). A influência da quantidade de cigarros e os anos de consumo foram objeto de estudo de Almeida et al. (2008) em estudo de mucosa de tabagistas através das citoqueratinas (CKs), que observou que os anos de consumo de cigarro apresentaram maior influência na expressão das CKs do que o número de cigarros consumidos por dia. Em contraste, Lima (2007), em avaliação de micronúcleos em fumantes, constatou maior influência no número de cigarros consumidos por dia do que os anos de tabagismo.

A ação do álcool não foi significativa na expressão da survivina (língua $p= 0,67$; assoalho $p= 1,0$), embora tenha ocorrido com maior expressão no assoalho bucal (42% com escore máximo) comparado à língua (57% com escore 4). O álcool leva ao aumento da permeabilidade da membrana celular, facilitando a penetração do carcinógeno na célula (Ogden et al. 2005), principalmente em áreas de represamento de saliva como bordos e ventre lingual, assoalho bucal e trígono retromolar (Almeida 2008).

A avaliação da expressão da survivina nos sexos masculino e feminino para assoalho bucal ($p= 0,65$) não foi relevante, porém para localização em bordo lingual foi quase significativa ($p= 0,059$), uma vez que os maiores escores de avaliação estão atribuídos ao sexo masculino. Tavares (2004), em estudo citológico da

mucosa bucal de mulheres em diferentes fases do ciclo menstrual, sugere efeito protetor hormonal conferido às mulheres.

A expressão da survivina ocorreu de maneira mais uniforme nos indivíduos abaixo de 54 anos comparado ao grupo acima ou igual a 54 anos, onde 46,6% dos casos receberam o maior escore de avaliação para assoalho bucal, embora sem significado estatístico importante (assoalho $p= 0,87$; língua $p= 0,38$). Isto pode ser explicado pelo fato de que indivíduos de menor faixa etária possuem maior *turn over* epitelial eliminando com maior facilidade as células alteradas (Mc Cance e Huether 1998).

A análise de Papanicolaou revelou predominância de esfregaços classe II, o que pode ser explicado pelo tabagismo como carcinógeno e agente inflamatório. A inflamação e ação do tabaco podem ser percebidas além da presença de células inflamatórias pelas alterações celulares de descoloração das células, presença de halo perinuclear e também pela queratinização da mucosa observada pelo aumento dos grânulos de querato-hialina como efeito protetor do organismo.

O tabaco também levou a alteração da maturação celular observada pelo grande número de células superficiais descamadas ainda com núcleo. Esta alteração corrobora com a menor maturação epitelial encontrada por Pavanello et al. (2006) em avaliação das células da mucosa jugal de universitários fumantes e por Fontes et al. (2008) em tabagistas crônicos 20 cigarros/dia/30 anos.

A positividade para survivina foi observada em 85,7% dos casos avaliados de leucoplasias bucais neste estudo, com maior

expressão nas camadas espinhosas e distribuição uniforme da expressão nas camadas superficiais. A expressão em camadas superficiais também foi constatada em tecidos displásicos bucais por Kitakawa (2006) e Jane et al. (2006), que fomentaram as idéias iniciais para este estudo.

A associação entre a expressão da survivina não foi significativa para o grau de displasia epitelial leve ($p= 0,63$), moderado ($p= 0,08$) e intensa ($p= 0,36$) em concordância com os achados de Lo Muzio et al. (2003) onde 94% de tecidos displásicos intra-bucais foram positivos para survivina sem associação com grau de displasia histopatológica. Em contraste, Jane et al. (2006) encontrou relação de aumento na expressão da survivina conforme o grau de displasia; Lin et al. (2005) encontraram 97% de tecidos displásicos bucais positivos para survivina que posteriormente evoluíram para CE bucais com respectivo aumento da expressão da survivina.

Para os casos de CE bucais avaliados, a expressão da survivina foi positiva em 83,3% do total avaliado. A literatura refere números bem variados a respeito da presença da survivina em CE bucais: 58% (Tanaka et al. 2003); 82,7% (Lo Muzio et al. 2003); 98% (Lin et al. 2005) e 100% (Schussel 2007).

À semelhança dos resultados encontrados para o grupo fumantes, a expressão da survivina foi maior nos casos de CE bucais localizados em assoalho bucal do que em língua ($p= 0,03$), provavelmente devido à maior ação de carcinógenos promotores como o álcool neste local.

A comparação entre a expressão da survivina nas leucoplasias foi negativa para sexo ($p= 0,97$) e idade ($p= 0,59$), bem como nos casos de CE bucais: sexo ($p= 0,38$) e idade ($p=0,76$). A avaliação isolada de tais variáveis não foi significativa neste estudo, sendo importante associar fatores de risco como consumo de tabaco e álcool.

A localização intra-celular da survivina foi 100% citoplasmática no grupo de tabagistas crônicos, e nos grupos de leucoplasias bucais e CE bucais foi de 85,7% citoplasmática e 14,28% nuclear. No grupo CE bucais todos os casos de expressão nuclear ocorreram em assoalho bucal. A survivina citoplasmática é considerada por Qui et al. (2010) como citoprotetora. Jane et al. (2006) observaram a survivina citoplasmática em leucoplasias bucais e em CE bucais bem diferenciados, enquanto a survivina nuclear foi encontrada em CE indiferenciados. No entanto, muitos autores consideram a positividade nuclear indicativa de prognóstico favorável e a marcação citoplasmática de prognóstico ruim (Engels et al. 2007; Freier et al. 2006; Tonini et al. 2005).

Na presente pesquisa não foi possível relacionar a expressão citoplasmática ao prognóstico, entretanto, torna-se importante o acompanhamento dos indivíduos que fumam, haja vista que todos os casos apresentaram positividade citoplasmática.

A avaliação da expressão da survivina na mucosa bucal de fumantes crônicos, em leucoplasias bucais e CE bucais indicaram que a survivina é uma proteína que participa de todas as etapas relacionadas a carcinogênese bucal.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos pela análise qualitativa da expressão da survivina na mucosa bucal de tabagistas crônicos, leucoplasias bucais e CE bucais e através da associação dos dados obtidos através das fichas de coleta e do tratamento estatístico conclui-se que:

- a) A survivina possivelmente participa da etapa de iniciação da carcinogênese, representada pela mucosa bucal de fumantes crônicos com 100% de expressão desta proteína;
- b) Não houve associação entre a quantidade de cigarros consumidos por dia e o tempo de tabagismo e a expressão da survivina;
- c) Não foi encontrada correlação entre a expressão da survivina e o grau de displasia epitelial;
- d) Nem todos os casos de CE bucais expressaram survivina;
- e) A maioria da expressão da survivina foi citoplasmática nos grupos estudados.

8 REFERÊNCIAS*

Acha A, Ruesga MT, Rodríguez MJ, Pancorbo MAM, Aguirre JM. Aplicaciones de la citología oral por raspado (exfoliativa) en el cancer y precáncer oral. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 Oct; 10(2): 95-102.

Almeida JD. Avaliação da expressão de citoqueratinas na citologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes fumantes [tese] São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP Univ. Estadual Paulista; 2008.

Almeida JD, Cabral LAG. Diagnóstico do carcinoma bucal: uso da citologia esfoliativa como método auxiliar. *Rev Gaúcha Odontol*. 1992 mai./jun.; 40(3):167-70.

Almeida JD, Cabral LAG, Brandão AAH. Exfoliative cytology as a diagnostic method in estomatology. *J Dent Res*. 1994;73(4):765.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [Abstract]. *Nat Med*. 1997; 3(8):917-21.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Azuhata T, Scott D, Takamizawa S, Wen J, Davidoff A, Fukuzawa M, et al. The inhibitor of apoptosis protein survivin is associated with high-risk behavior of neuroblastomas. *J Pediatr Surg* 2001; 36(12):1785-91.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology & genetics. Head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumours; 2005 Cap.3 177–80.

Beale LS. Results of chemical and microscopical examination of solid organs and secretions: examination of sputum from case of pharynx and adjacent parts. *Arch Med*. 1860/1861; 2(1):44-6.

Campisi G, Di Fede O, Giovanelli L, Capra G, Greco I, Calvino F et al. Use of fuzzy neural networks in modeling relationships of HPV infection with apoptotic and proliferation markers in potentially malignant oral lesions. *Oral Oncol* 2005; 41(10):994-1004.

Chaiyarit P, Jintakanon D, Klanrit P, Siritapetawee M, Thongprasom K. Immunohistochemical analyses of survivin and heat shock protein 90 expression in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 2009; 38(1):55–62.

De Maria S, Pannone G, Bufo P, Santoro A, Serpico R, Metafora S, et al. Survivin gene-expression and splicing isoforms in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009; 135(1): 107-16.

Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: More than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell cycle* 2008;7(8):1036-46.

Duffy MJ, O'Donovan N, Brennan DJ, Gallagher WM, Ryan BM. Survivin: A promising tumor biomarker. *Cancer Letters* 2007;249(1): 49–60.

Engels K, Kauner SK, Metzler D, Simf C, Struschka O, Bier C et al. Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. *J Pathol* 2007; 211(5): 532-40.

Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. *J Can Dent Assoc* 2002;68(10): 617-21.

Felefli S, Flaitz CM. The oral brush biopsy: its as easy as 1,2,3. *Texas Dent J.* 2000 Jun.; 117(6): 20-4.

Folsom TC, White CP, Bromer L, Canby FH, Garrington GE. Oral exfoliative estudy. Review of the literature and report of a three-year study. *Oral Surg.* 1972 Jan; 33(1): 61-73.

Fontes PC, Corrêa GHM, Issa JS, Almeida JD. Quantitative analysis of AgNOR proteins in exfoliative cytology specimens of oral mucosa from smokers and non-smokers. *Anal Quant Cytol Histol.* 2008; 30(1):16-24.

Fontes PC, Corrêa GHM, Issa JS, Brandão AAH, Almeida JD. Comparison of exfoliative Pap Stain and AgNOR counts of the tongue in smokers and nonsmokers. *Head Neck Pathol* 2008; 2:157-62.

Freier K, Pungs S, Sticht C, Flechtenmacher C, Lichter P, Joos S, et al. High survivin expression is associated with favorable outcome in advanced primary oral squamous cell carcinoma after radiation therapy. *In J Cancer* 2006;120(4): 942-6.

Freitas MD, Garcia AG, Abelleira AC, Martins Carneiro JL, Rey JMG. Aplicaciones de la citología exfoliativa em el diagnóstico del cáncer oral. *Med Oral*. 2004 Jan.; 9: 355-61.

Giovanelli L, Campisi G, Lama A, Giambalvo O, Osborn J, Margiotta V, et al. Human papilloma virus DNA in oral mucosa lesions. *J Infect Dis*. 2002;185(6):833-6.

Holland F. Role of the cytopathologist. In: *Cancer medicine*. 5th ed. London: American Cancer Society; 2000.

Hsue SS, Chen YK, Lin LM. Expression of survivin and XIAP for DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis is associated with p53accumulation. *OralOncol*.2008, Jan; 44(1):43-9.

Jane C, Nerurkar AV, Shirsat NV, Deshpande RB, Amrapurkar AD, Karjodkar FR. Increased survivin expression in high-grade oral squamous cell carcinoma: a study in Indian tobacco chewers. *J Oral Pathol Med*. 2006 Nov; 35(10):595-601.

Jones AC, Pink FE, Sandow PL, Stewart CM, Migliorati CA, Baughman RA. The Cytobrush Plus cell collector in oral cytology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994 Jan.;77(1):101-4.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004 Cap 3: 59-63.

Kerr JFR. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971; 105(1):13-29. *apud*: Nikitatis NG, Sauk JJ, Papanicolaou SI, Baltimore D, Greece A. The role of apoptosis in oral disease: mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(4):476-90.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4):239-56. *apud*: Nikitatis NG, Sauk JJ, Papanicolaou SI, Baltimore D, Greece A. The role of apoptosis in oral disease: mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutic opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(4):476-90.

Khan Z, Tiwari RP, Mulherkar R, Sah NK, Prasad GB, Shrivastava BR, et al. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: Correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck* 2009 Aug; 31(8):1039-48.

Kim YH, Kim SM, Kim YK, Hong SP, Kim MJ, Myoung H. Evaluation of survivin as a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2010; 39(5):368-75.

Kitakawa D. Estudo imunoistoquímico da proteína inibidora da apoptose, survivina, no processo de carcinogênese quimicamente induzida pela 4NQO (4-nitroquinilona 1-óxido) em mucosa lingual de ratos *Wistar* [tese] São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP Univ Estadual Paulista; 2006.

Kustner EC, Costa IF, López JL. Riesgo de cáncer oral y marcadores moleculares. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004; 9(3):377-84.

Lam AK, Saleh S, Smith RA, Ho Y. Quantitative analysis of survivin in colorectal adenocarcinoma: increased expression and correlation with telomerase activity. *Hum Pathol.* 2008 Aug; 39(8):1229–33.

Lens SMA, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol* 2006 Dec; 18(6):616–622.

Lima CF. Avaliação quantitativa de micronúcleos na citologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes dependentes químicos [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP Univ Estadual Paulista; 2007.

Lin C, Hung H, Kuo R, Chiang C, Kuo MY. Survivin expression predicts poorer prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol.* 2005 Jul; 41(6):645-54.

Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more life than Bcl2. *Oncog* 2003 Nov; 22(53):8568-80.

Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, MD Mignogna, Mariggio A, Salvatore G et al. Expression of the Apoptosis Inhibitor Survivin in Aggressive Squamous Cell Carcinoma. *Exp Mol Pathol.* 2001 Jun; 70(3):249–54.

Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, Staibano S, Mignogna MD, De Rosa G, et al. Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *Dent Res.* 2003; 82(11):923- 8.

Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Marigió MA, Procaccini M et al. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003 Dec 15; 89(12):2244-48.

Lo Muzio L, Campisi G, Giovanelli L, Ammatuna P, Greco I, Staibano S, et al. HPV DNA and survivin expression in epithelial oral carcinogenesis: a relationship? *Oral oncol.* 2004 Aug; 40(7):736-41.

Lo Muzio L, D'Angelo M, Procaccini M, Bambini F, Calvino F, Florena AM, et al. Expression of cell cycle markers and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma: use of fuzzy neural networks. *Int J Cancer.* 2005 Jul; 115(5):717– 23.

Lodi G, Franchini R, Bez C, Sardella A, Moneghini L, Pellegrini C et al. Detection of survivin mRNA in healthy oral mucosa, oral leukoplakia and oral cancer. *Oral Disease* 2010 Jan; 16(1):61-67.

Loro LL, Vintermyr OK, Johannssen AC. Cell Death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med.* 2003 Mar; 32(3):125-38.

Mashber S, Samit A. Early detection, diagnosis and management of oral and oropharyngeal cancer. *Cancer J Clin.* 1989; 39(67): 88-9.

McCance KL, Huether SE. *Pathophysiology.* 3th. Editora Mosby; 1998 Chap 02.

Mc Cullough MJ, Farah CS. The role of alcohol in the oral carcinogenesis with particular reference to alcohol-containing mouthwashes. *Austr Dental J.* 2008 Dec; 53(4):302-05.

Montgomery PW, Von Haam EA. Study of the exfoliative cytology of the oral leukoplakia. *J Dent Res.* 1951 Apr;30(2):260-4.

Mehrota R, Hullmann M, Smeets R, Reicherts E, Driemel O. Oral Cytology revisited. *J Oral Pathol Med*. 2009 Feb; 38(3):161-66.

Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug; 14(16):5000-05.

Neville BW, Damm,DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999.

Nikitatis NG, Sauk JJ, Papanicolaou SI, Baltimore D, Greece A. The role of apoptosis in oral disease: mechanisms; aberrations in neoplastic, aumotimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutics oportunities. *Oral Surg Orl Med Oral Pthol Oral Radiol Endod*. 2004; 97(4):476-90.

O' Connor DS, Schechner JS, Adida C, Mesri M, Rothermel AL, Li F, et al. Control of apoptosis during angiogenesis by survivin expression in endothelial cells. *Am J Pathol*. 2000 Fev; 156(2):393-8.

Ogden GR, Cowpe JG, Green MW. Quantitative exfoliative cytology of normal buccal mucosa: effect of smoking. *J Oral Pathol Med*. 1990; 19(3):53-5.

Ogden GR, Cowpe JG, Green M. Cytobrush and wooden spatula for oral exfoliative cytology: a comparison. *Acta Cytol*. 1992 Sept./Oct; 36(5):706-10.

Ogden GR, et al. Keratin profile of normal and malignant oral mucosa using exfoliative cytology. *J Clin Pathol*. 1993 Apr; 46(4):352-6.

Ogden GR. Alcohol and oral cancer. *Alcohol*. 2005 Apr; 35(3):169-73.

Oliveira LU, Lima CF, Issa JS, Fontes PC, Almeida JD. Avaliação comparativa quantitativa de fumantes crônicos e não fumantes [painel acadêmico]. *Anais 25^o Congresso Internacional de Odontologia de São Paulo*; 2007. São Paulo: CIOSP. p.128-9.

Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Am J Obst Gynecol*. 1941 Aug; 42(2): 193-206.

Pavanello MB, Prado FA, Balducci I, Brandão AAH, Almeida JD. Cytologic analysis of alterations induced by smoking and by alcohol consumption. *Acta Cytol*. 2006; 50(4):435-40.

Pitot HC, Dragan YP. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Faseb J* 1991 Jun; 5(9):2280-6.

Queiroz JB, Burim RA, Lima CF, Brandão AAH, Cabral LAG, Almeida JD. Avaliação qualitativa comparativa da citologia esfoliativa com cytobrush e espátula metálica [abstract Ib 209]. *Braz Oral Res*. 2006; 20 (supp.); 115. Trabalho apresentado na Annual SBPQO Meeting.

Qui G, Kudo Y, Ando T, Tsunematsu T, Shimizu N, Siriwardena SBSM et al. Nuclear survivin expression is correlated with malignant behaviors of head and neck cancer together with Aurora-B. *Oral Oncol*. 2010 Apr; 46(4):263-70.

Reibel J. Tobacco and oral disease. *Med Princ Pract*. 2003; 12(1): 22-32.

Reibel J. Tobacco or oral health. *Bulletin of the World Health Organization*. 2005. 83(9): 643-4.

Ribeiro DA, Kitakawa D, Domingues MA, Cabral LA, Marques ME, Salvadori DM. Survivin and inducible nitric oxide synthase production during 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis: a possible relationship. *Exp Mol Pathol*. 2007 Aug;83(1):131-7.

Rossi BM, Pinho M. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo: Lemar, 1999 Cap.2:57-61.

Sandler HC, Stahl SS. Exfoliative cytology as a diagnostic aid in detection of oral neoplasms. *J Oral Surg*. 1958 Sept; 16(3): 414-8.

Seitz KH, Stickel F. Acetaldeyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. *Genes Nutr*. 2009; Oct 22. [Epub ahead of print]

Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*. 2004 Oct 15; 64(20):7183-90.

Schüssel JL. *Avaliação da expressão imunistoquímica das proteínas survivina e β -catenina em queilite actínica e carcinoma epidermóide em lábio [dissertação]*. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

Smith SD, Wheeler MA, Plescia J, Colberg JW, Weiss RM, Altieri DC. Urine detection of survivin as a diagnosis of bladder cancer. *J Am Med Assoc*. 2001 JAN 17; 285(3):324-8.

Smith J, Rattay T, McConkey C, Helliwell, Mehanna H. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: A systematic review. *Oral Oncol* 2009 Aug; 45(8):647-53.

Srinvasula SM e Ashwell JD. IAPs: What' s in a name? *Molec Cell*. 2008 April, 30:123-35.

Sudbo J, Lippman SM, Lee JJ, Mao L, Kildal W, Sudbo A, et al. The influence of resection and aneuploidia on mortality in oral leukoplakia. *N Engl J Med*. 2006; 350(14):1405-13.

Sthipintawong C, Leong ADY, Vinyuvat S. Immunostaining o cell preparations: a comparative evaluation of common fixatives and protocols. *Diagn Cytopathol*. 1996;15:167-74.

Tanaka C, Uzawa K, Shibahara T, Yokoe H, Noma H, Tanzawa H. Expression of an inhibitor of apoptosis survivin, in oral carcinogenesis. *J Dent Res*. 2003; 82(8):607-11.

Tavares P.G. Avaliação do epitélio bucal, através da citologia esfoliativa em pacientes no pós-menopausa submetidas a reposição hormonal [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP Univ Estadual Paulista; 2004.

Tessema M, Lehmann U, Kreipe H. Cell cycle and no end. *Virchows Arch*. 2004 Apr; 444(4):313-23.

Tommasi AF. Diagnóstico em patologia bucal. 3ed. São Paulo: Pancast; 2002. Cap.2, p.48-51.

Tonini G, Vicenzi B, Santini D, Scarpa D, Vasaturo T, Malacrino C, Coppola R, et al. Nuclear and cytoplasmic expression of survivin in 67 surgically resected pancreatic cancer patients. *British Journal of cancer*. 2005 Jun; 92(12):225-32.

Van der waal I, Schepman KP, van der Meij EH. A modified classification and staging system for oral leukoplakia. *Oral Oncol*. 2000 May; 36(3):264-6.

Vankifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death trough a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*. 2008 Jul; 15(7): 1153–1162.

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008 Mar; 37(3):127-33.

Zhu H, Chen XP, Zhang WG, Luo SF, Zhang BX. Expression and significance of new inhibitor of apoptosis protein survivin in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2005 Jul; 11(25):3855-59.

Apêndice - Ficha de coleta sobre o estudo citológico da “Expressão da survivina em diferentes condições relacionadas à carcinogênese intra-bucal humana”.

Nome:.....

Sexo:.....Cor:.....Idade:.....Data nasc...../...../.....

Residência:.....

Profissão:.....

Bairro.....Cidade.....Estado.....Fone.....

1. Você fuma? sim não

2. Se fuma, qual o tipo?

cigarro de papel cigarro de papel sem filtro cachimbo
 charuto

3. Há quanto tempo?

.....

4. Qual a frequência do seu consumo de cigarros?.....

1 a 3 vezes por mês. Quantos cigarros no total do mês?.....

1 a 3 vezes por semana. Quantos cigarros no total da semana?.....

4 a 6 vezes por semana. Quantos cigarros no total da semana?.....

todos os dias. Quantos cigarros no total de cada dia?.....

5. Você faz uso de bebidas alcoólicas mesmo que seja com pouca frequência?

sim não

6. Qual a frequência do seu consumo de bebidas alcoólicas?

- 1 ou menos de uma vez por mês 2 a 3 vezes por mês
 1 a 3 vezes por semana 4 ou mais vezes por semana

7. Que tipo de bebida você consome quando bebe?

- cerveja batida caipirinha uísque vinho
 outras.....

8. Quantas doses (copos) você consome num dia típico em que está bebendo?

- 1 a 2 3 a 4 5 a 6 7 a 9 10 ou mais

* destilado (whisky, vodka, pinga): 36ml;

* cerveja: 350 ml.

* vinho: 120ml

9. Qual a frequência que você consome 6 ou mais doses de bebidas alcoólicas em uma só ocasião?

- nunca menos que mensalmente semanalmente
 mensalmente diariamente

10. Você faz uso de cigarro e álcool simultaneamente?

- sim não

11. Quando você bebe, consome mais cigarro?

- sim não

Quanto a mais você consome?.....

12. Você faz, ou já fez, uso de outras substâncias químicas ? Quais?

- sim não

.....

13. Com que frequência você consome, ou consumia, estas substâncias?

- 1 ou menos de uma vez por mês uma vez ao dia
 1 a 3 vezes por semana mais de uma vez ao dia

14. Faz uso de algum medicamento? sim não

Qual(is)?.....
.....
.....

15. Exame clínico:

Extra-bucal.....
.....
.....

Intra-bucal.....
.....
.....

16. Procedimentos Realizados:

.....
.....
.....
.....

* OMS: AUDIT. Projeto viver bem 2000. Folheto UNESP.

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – São José dos Campos

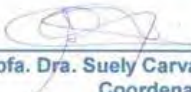
 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Al. São Diniz
CEP: 12201-970 - F. (12) 3947-9028
Fax: (12) 3947-9010 / suecy@fodjcamp.br



CERTIFICADO Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 026/2008-PH/CEP, sobre “Expressão da survivina em diferentes estágios da carcinogênese”, sob a responsabilidade de **CELINA FAIG LIMA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 13 de junho de 2008.



Prof. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora

Anexo B – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – São José dos Campos

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Alg. Duménil and Braga, 777 - São José dos Campos - CEP 12241-900 - F: (12) 3947-5000 - FAX: (12) 3947-8024



Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

São José dos Campos, 26 de fevereiro de 2010

Ofício nº 05/10-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	CELINA FAIG LIMA
Projeto	Expressão da survivina em diferentes estágios da carcinogênese
PARECER	
<p>Por solicitação da Pesquisadora Responsável, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, para Expressão da survivina em diferentes condições relacionadas às etapas da carcinogênese intra-bucal humana Convalidando dessa forma o Protocolo nº 026/2008-PH/CEP de 13/06/2008.</p>	

Atenciosamente,

Prof. Adjunta JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora

Anexo C – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – São José dos Campos

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Durgo, 777 - São Jôão - CEP 12201-970 - F. (11) 3072-9600 FAX (11) 3072-9026



Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

São José dos Campos, 18 de agosto de 2010

Ofício nº 051/10-CEP

Prezado(a) Sr.(a)	CELINA FAIG LIMA
Projeto	Expressão da survivina em diferentes condições relacionadas às etapas da carcinogênese intra-bucal humana
PARECER	
<p>Por solicitação da Pesquisadora Responsável, foi alterado o título do Projeto acima mencionado, para "Expressão da survivina em diferentes condições relacionadas à carcinogênese intra-bucal humana" Convalidando dessa forma o Protocolo nº 026/2008-PH/CEP de 13/06/2008 e Ofício nº 05/10/CEP/h de 26/02/2010.</p>	

Atenciosamente,


Profa. Adjunto JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora

Anexo D – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa - CAPPesq



APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/01/2010, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **1362/09**, intitulado: "**EXPRESSÃO DA SURVININA EM DIFERENTES ESTÁGIOS DA CARCINOGENESE**", apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Jaqueline Scholz Issa**

Pesquisador (a) Executante: **Celina Faig Lima**

CAPPesq, 29 de Janeiro de 2010

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
 RECEBIDO
 12/02/10
 Elaine

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
 Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua
 Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011
 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Lima, CF. Expression of survivin in different conditions related to human intra-oral carcinogenesis. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Univ. Estadual Paulista; 2010.

ABSTRACT

Survivin is an inhibitor of apoptosis protein that plays a role in cell cycle control and the mechanism of carcinogenesis. The aim of the present work was to study the clinicopathological correlation of survivin expression in different conditions related to intra-oral carcinogenesis. This may be useful to highlight important aspects of oral carcinogenesis steps. Three groups were analyzed. They were formed in part by cytological material collected from patients of Heart Institute's Patient Center and the Smoking Cessation Program of the University Hospital, University of São Paulo Medical School (INCOR-HCFMUSP) and material of Laboratory of Oral Pathology, São José dos Campos Dental School. The first group consisted of cytologic material obtained from the left side of the tongue and mouth floor of 30 patients who smoked more than 20 cigarettes/day/10years and had no history of malignant oral neoplasm or clinical signs at the site evaluated; the second group consisted of tissue samples from 21 patients with white lesions clinically classified as leukoplakia. The third group consisted of 42 tissue samples from patients diagnosed with oral squamous cell carcinoma. Patients who underwent exfoliative cytology were examined by medical history, extra and intra-oral clinical examination. The exfoliative cytology was performed using *cytobrush* to obtain two smears of each selected location. After performing the immunohistochemistry for anti-survivin the slides were analyzed qualitatively by light microscopy. One smear of mouth floor and tongue was stained and evaluated by the method of Papanicolaou. Statistical analysis was performed by Fisher's exact test, Mann-Whitney and X^2 . Survivin was positive in 100% of cytological material from the smokers, 85.7% of oral leukoplakia and 83.3% of oral squamous cell carcinoma. Fisher's exact test showed no association between the expression of survivin and daily cigarette consumption and duration of smoking on the tongue or mouth floor respectively: tongue ($p = 0.68$) ($p = 0.21$) and mouth floor: ($p = 0.69$) ($p = 0.69$). Higher expression of survivin was observed in mouth floor than tongue, by Mann-Whitney test ($p = 0.001$). Survivin expression was not statistically correlated to cigarette consumption, although it was more intense in the mouth floor. The evaluated expression of survivin in oral mucosa of heavy smokers, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma indicated that survivin is a protein that participates in all steps related to oral carcinogenesis.

KEYWORDS: survivin, cytodiagnosis, oral mucosa, squamous cell carcinoma, smoking, carcinogenesis.