



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

NATHALIA CURTO DOS SANTOS

**ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DA
SURVIVINA NA CITOLOGIA ESFOLIATIVA DA
MUCOSA BUCAL DE PACIENTES COM
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS INTRA-
BUCAL E FUMANTES CRÔNICOS**

2015

NATHALIA CURTO DOS SANTOS

**ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO DA SURVIVINA
NA CITOLOGIA ESFOLIATIVA DA MUCOSA BUCAL DE
PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
INTRA-BUCAL E FUMANTES CRÔNICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP- Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte das exigências para a obtenção do grau de CIRURGIÃO-DENTISTA.

Orientadora: Profa. Dra. Janete Dias Almeida

Co-orientador: Dra. Celina Faig Lima Carta

São José dos Campos

2015

AUTORIZAÇÃO

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

São José dos Campos, 07 de outubro de 2015.

Nathalia Curto dos Santos

E-mail: nathalia.santos@ict.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Profª Adj Janete Dias Almeida (Orientadora)
Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Profª Tit Yasmin Rodarte Carvalho
Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Profª Dra Luciane Dias de Oliveira
Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

São José dos Campos, 07 de outubro de 2015.

DEDICATÓRIA

À minha família, por sua capacidade de acreditar em mim e investir em mim.

Mãe, seu cuidado, incentivo e dedicação me deram a esperança e força para seguir. Sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Adj Janete Dias Almeida, pela paciência e incentivo, que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

À minha co-orientadora, Dra Celina Faig Lima Carta, que sempre foi muito solícita, me auxiliando em todas as etapas deste trabalho.

Agradeço também a todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e na minha formação e aos meus amigos pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas.

Estudo comparativo da expressão da survivina na citologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes com carcinoma de células escamosas intra-bucal e fumantes crônicos*

Comparative study of survivin expression in the exfoliative cytology of the oral mucosa of patients with intra-oral squamous cell carcinoma and chronic smokers

RESUMO

A survivina é uma proteína inibidora da apoptose que atua no controle do ciclo celular e participa do mecanismo de carcinogênese. Este trabalho tem como proposição verificar a correlação clínico patológica da expressão da survivina na citologia esfoliativa da mucosa bucal de fumantes crônicos, pacientes com carcinoma de células escamosas (CCE) intra-bucal e mucosa bucal posterior a remoção dos CCE. Foram formados 03 grupos: Grupo 1: 26 pacientes que fumaram mais de 20 cigarros/dia/10 anos e que não apresentavam história de neoplasia maligna bucal, ou sinais clínicos visíveis no local examinado. Grupo 2: 26 pacientes com CCE intra-bucal e Grupo 3: 22 pacientes tratados cirurgicamente para CCE intra-bucal, há pelo menos 01 mês. A imuno-histoquímica foi realizada em 01 esfregaço de cada grupo e analisada por microscopia comum quanto à extensão e intensidade de células positivas para survivina. A expressão de survivina foi observada em 100% dos casos no grupo 1, 88,5% no grupo 2 e 100% no grupo 3. Em relação aos grupos 1 e 3 a expressão da survivina com localização citoplasmática foi 100%, enquanto no

*Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico Brazilian Dental Science (ISSN 2178-6011).

grupo 2 foi 87,5%. Expressão citoplasmática e nuclear foi observada apenas no grupo 2, sendo 7,69%. Os resultados foram correlacionados com dados clinicopatológicos pelo teste exato de Fisher com relação significativa entre a cessação de fumar e intensidade ($p = 0,015$) para o grupo 2. A intensidade de expressão nos esfregaços citológicos da survivina esteve relacionada à cessação do tabagismo no grupo com CCE bucal. A carga tabágica (maço/anos) não influenciou na expressão da survivina.

PALAVRAS-CHAVE

Proteína de suscetibilidade a apoptose celular; Apoptose; Carcinoma de células escamosas; Citodiagnóstico; Mucosa bucal; Carcinogênese; Tabaco.

ABSTRACT

Survivin protein is an inhibitor of apoptosis that plays a role in cell cycle control and the mechanism of carcinogenesis. The aim of this study was to verify the clinic pathological correlation of survivin expression in exfoliative cytology of chronic smokers, mucosa of patients with intra-oral squamous cell carcinoma (OSCC) and also from mucosa after surgical removal of OSCC. Patients were divided in 03 groups: Group 1: 26 patients who smoked more than 20 cigarettes/day/10years with no history of oral malignant neoplasm, or any clinical sign visible at examination. Group 2: 26 patients who had OSCC and Group 3: 22 patients surgically treated of OSCC for at least 01 month. Immunohistochemistry of the smears from each group

was analyzed by light microscopy to extent and intensity of survivin positive cells. Survivin expression was observed in 100% of cases in group 1, 88.5% in group 2 and 100% in group 3. Groups 1 and 3 showed cytoplasmic expression in 100% of the cases, while group 2 showed it in 87.5%. Cytoplasmic and nuclear expression was 7.69% observed only in group 2. The results were association with clinicopathological data by Fisher's exact test and it was significant to smoke cessation in group 2 on intensity ($p=0.015$) of survivin expression. The intensity of survivin expression was related to smoking cessation in group 2. Smoking history (pack/years) showed no influence survivin expression.

KEYWORDS

Cellular apoptosis susceptibility protein; Apoptosis; Carcinoma, squamous cell; Cytodiagnosis; Mouth mucosa; Carcinogenesis; Tobacco.

INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a incidência de neoplasias malignas em boca no Brasil em 14.170 novos casos para o ano de 2012[1], entre elas a de maior interesse na área estomatológica é a representada pelo carcinoma de células escamosas (CCE), a neoplasia epitelial intra-bucal mais frequente. Muitos biomarcadores têm sido estudados com o objetivo de diagnosticar precocemente a doença, determinar o tipo de tratamento e prognóstico para cada caso.

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 [2, 3].

A apoptose é caracterizada pela ruptura de organelas e do citoesqueleto celular bem como encolhimento e protrusões da membrana, condensação e fragmentação da cromatina, e formação de pequenos corpos apoptóticos que serão fagocitados por macrófagos e células vizinhas [4].

A survivina é uma proteína inibidora da apoptose e reguladora da divisão celular. Componente da família das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs: Inhibitors of Apoptosis) pertencente a classe III deste grupo e também possui atividade importante sobre a angiogênese [5] 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 (VEGFA: vascular endothelial growth factor A) [6].

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 [7]. Elas

possuem em sua estrutura um domínio denominado baculoviral (BIR: báculo vírus inhibitor of apoptosis protein repeat), localizado na porção N – terminal podendo ser único, como no caso da survivina, duplos ou triplos, formados por até 70 aminoácidos [8].

A survivina foi descrita primeiramente por Ambrosini et al. [9] em estudo de carcinomas e linfomas, constatando a proteína em carcinomas de pulmão, pâncreas, cólon e mama. Também constataram a expressão da survivina em 50% dos linfomas não-Hodgkin de alto grau.

A survivina apresenta atividade na fase G2/M do ciclo celular. Ela é componente de um complexo proteico cromossômico temporário, que é essencial para alinhamento do cromossomo durante a mitose e citoquinese [10]. 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 citoquinese ela é encontrada no ponto de união entre as duas células em formação e posteriormente é expulsa durante a separação das células-filhas [11-2]. Como resultado de sua deleção pode ocorrer acúmulo de células multinucleadas poliplóides [10].

Segundo De Maria et al. [13] existem cinco isoformas de survivina (survivina, survivina-2, survivina-2B, survivina-3B, e survivina-Ex3), que foram avaliadas em 22 pacientes com CCE. Os autores verificaram que a isoforma survivina é a mais prevalente em CCE, seguida pelas isoformas survivina-Ex3 e survivina-2B, enquanto a survivina-3B é a de menor prevalência no carcinoma bucal. Segundo

Qui et al. [14] a survivina nuclear é uma subunidade do complexo cromossômico de passagem (CPC: chromosomal passenger complex) para regulação da divisão celular, enquanto a survivina citoplasmática é citoprotetora interferindo na ação das caspases. Os autores realizaram correlação entre a expressão da survivina, Ki-67 (MKI67: Ki-67 marker of proliferation) 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. [15] avaliaram 71 casos de CCE bucais e de orofaringe e observaram que a expressão nuclear na survivina foi considerada favorável, enquanto sua expressão citoplasmática foi desfavorável. Tonini et al. [16] 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 desordens com potencial de transformação maligna pode estar relacionada à malignização e prognóstico desfavorável [9; 17- 21].

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. [22] que constataram, através de reação em cadeia da polimerase com

transcrição reversa (RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction), a presença de RNAm (RNA mensageiro) da survivina em 15 espécimes de mucosa bucal normal (gengiva), 17 de leucoplasias e 17 de CCE 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 CCE, 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 CCE em boca, mas que ainda não apresentam alterações clínicas visíveis.

A expressão da survivina em casos de CCE previamente diagnosticados foi estudada por Lo Muzio et al. [17], que avaliaram 135 CCE, sendo 46 intra-bucais e 89 cutâneos. A expressão foi revelada em 26 casos intra-bucais 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 CCE indiferenciados e nos casos onde já havia comprometimento de linfonodos. Os mesmos autores realizaram posteriormente em 2003, estudo de 16 casos de tecidos intra-bucais com displasia que evoluíram posteriormente para CCE e verificaram a expressão da survivina em 94% dos casos, porém não observaram correlação de tal expressão com o grau de displasia [18]. Este grupo de pesquisadores também avaliaram 110 casos de CCE bucais, 6 linfonodos comprometidos e uma única metástase à

distância. A survivina foi expressa em 91 casos dos CCE (82,7%) e todos os 07 casos de metástases (100%).

Destarte, verifica-se a oportunidade de realizar a investigação da expressão da survivina em CCE e comparar com a expressão em mucosa bucal em fumantes crônicos e após a remoção da lesão, através do exame citológico, na busca de verificar a correlação clinicopatológica da expressão imuno-histoquímica da survivina, estabelecendo um perfil evolutivo de sua expressão na carcinogênese bucal e contribuindo para monitoramento e prognóstico dos casos.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção das amostras

Foram constituídos três grupos divididos da seguinte forma:

. Grupo 1 (tabagista crônico): constituído por material citológico coletado da mucosa bucal de 26 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, composto por 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);

. Grupo 2 (CCE): constituído por material citológico coletado de 26 pacientes com CCE intra-bucal que ainda não haviam sido submetidos a tratamento no Serviço de Atendimento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Pio XII em São José dos Campos-SP, e do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP);

. Grupo 3 (pós-cirurgia): constituído por material citológico coletado da mucosa bucal de 22 pacientes submetidos à remoção cirúrgica prévia de CCE intra-bucal sem tratamento complementar radioterápico, do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

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). O material do grupo tabagista crônico teve coleta e processamento aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do ICT de São José dos Campos – UNESP/CEP, sob protocolo número 026/2008PH/CEP 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. A realização de coleta e processamento do material dos grupos 2 e 3 foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do ICT-UNESP sob número 062/2011-PH/CEP (ANEXO A).

Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico intra e extra-bucal, e responderam a um questionário sob forma de entrevista onde foram indagados sobre hábitos nocivos relacionados à

carcinogênese intra-bucal. Os dados obtidos foram anotados em uma ficha de coleta (APÊNDICE A).

Os dados referentes ao consumo de cigarro foram utilizados para cálculo da carga tabágica, segundo Faria et al. [23]: número de cigarros consumidos dividido por 20 (01 maço) x anos de consumo.

Citologia esfoliativa e fixação das amostras

A citologia esfoliativa foi realizada utilizando-se o cytobrush na coleta de material do bordo lateral de língua ou do soalho bucal dos tabagistas crônicos, e no local do CCE nos pacientes do grupo 2 ou na região após remoção cirúrgica no grupo 3. Após realização dos esfregaços, as lâminas foram fixadas com spray alcoólico fixador e armazenadas em frasco plástico.

Realização da imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas pelo método avidina-biotina, na coloração dos complexos antígeno/anticorpo pela imunoperoxidase, no laboratório de imuno-histoquímica da Disciplina de Patologia do ICT de São José dos Campos - UNESP. O anticorpo policlonal para survivina utilizado foi o Clone SC-10811 (Santa Cruz Biotechnology) com a diluição 1:100.

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 de 1:1 de metanol e água oxigenada 20 vol. 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 Protein Block Serum-Free (DAKO) durante 10 min 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 1,5 cm 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), durante 30 min, em cuba umidificadora a temperatura ambiente com posterior aplicação do complexo terciário por 30 min;
 - j) duas lavagens em TRIS-pH 7,4, por 5 min cada;

- k) aplicação do complexo terciário (Kit LSAB, System-HRP K0690/DAKO) em cuba umidificadora por 30 min a temperatura ambiente;
- l) duas lavagens em TRIS-pH 7,4, por 5 min cada;
- m) aplicação de diaminobenzidina (DAB, DAKO) 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/ xilol;
- s) montagem das lâminas com Permaunt.

O controle positivo de todas as reações foi realizado em material obtido por PAAF (punção aspirativa por agulha fina) de seminoma e material histopatológico de CCE bucal. Para realização do controle negativo algumas lâminas foram processadas sem a aplicação do anticorpo primário.

Avaliação do material citológico

A avaliação das lâminas processadas pela técnica de imuno-histoquímica 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 semi-quantitativa 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 intracelular: 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.

Análise estatística

A análise dos dados obtidos foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis, teste de Dunn, bem como aplicação do teste exato de Fisher para identificação de associação entre as variáveis analisadas. O nível de significância dos testes foi de 5%.

RESULTADOS

A expressão da survivina ocorreu em 100% dos casos no grupo 1, 88,5% no grupo 2 e 100% para o grupo 3. Quanto à localização intracelular para os grupos 1 e 3 a expressão foi 100% citoplasmática, enquanto que para o grupo 2 foi 87,5% citoplasmática e 7,69% citoplasmática e nuclear concomitantemente. Nos dois casos de CCE onde houve a expressão citoplasmática e nuclear o estadiamento era T2N2MX e TXN2MX, respectivamente.

A análise comparativa entre os 3 grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($\alpha=5\%$) não mostrou diferença entre a expressão da survivina na extensão dos esfregaços avaliados, porém esta diferença foi observada quanto a intensidade de expressão onde houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,0134$). O teste de Dunn ($\alpha=5\%$) mostrou que esta diferença ocorreu entre os grupos 1 e 2 ($p = 0,0098$), bem como entre os grupos 1 e 3 ($p = 0,0137$).

As Figuras 1 e 2 mostram a extensão e intensidade da avaliação.

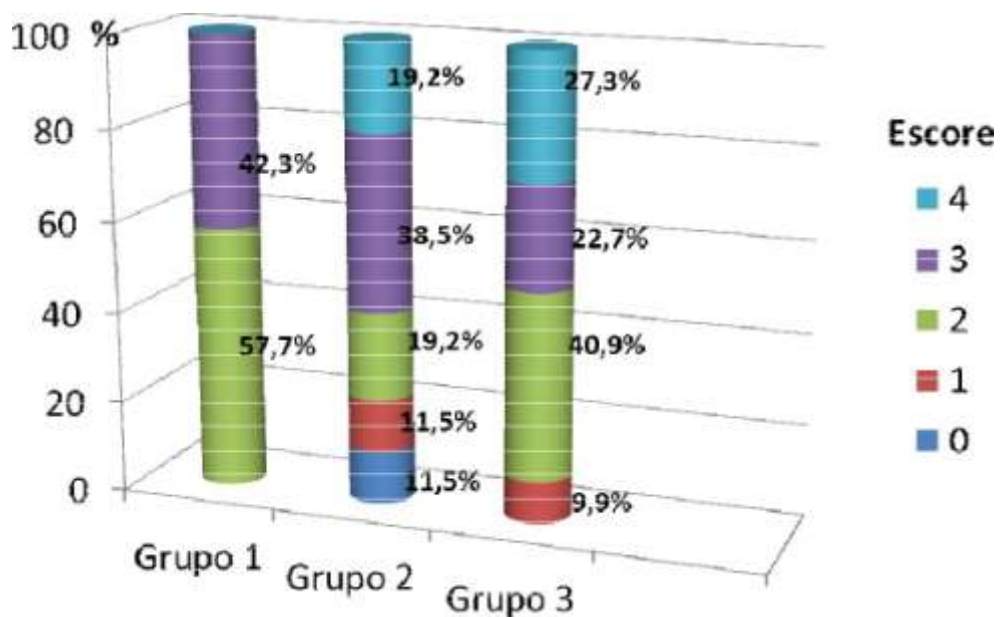


Figura 1 – Expressão da survivina segundo o percentual de células positivas na extensão do esfregaço: 0= nenhuma célula positiva; 1= 25% das células positivas; 2= 50% das células positivas; 3= 75% das células positivas; 4= 100% das células.

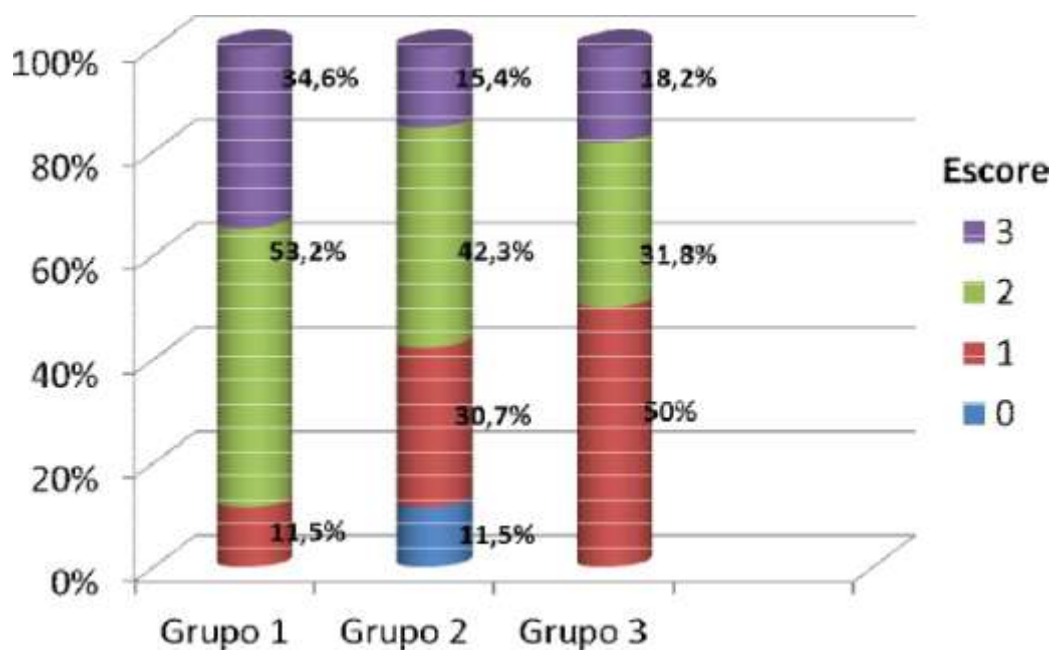


Figura 2 – Expressão da sobrevivência segundo a intensidade da imunoreatividade: 0= marcação negativa; 1= marcação fraca; 2= marcação moderada; 3= marcação forte.

Abaixo, o perfil da amostra avaliada está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Perfil da amostra avaliada

| Descritor | Grupo 1 (n=26) | Grupo 2 (n=26) | Grupo 3 (n=22) |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|
| Sexo* | 12 F; 14 M | 4 F; 22 M | 4 F; 18 M |
| Idade (anos) | 53,7 ± 10,7 | 57,9 ± 12,1 | 59,2 ± 11,4 |
| Fumantes | 26 | 09 | 03 |
| Número de cigarros/dia | 28,4 ± 10,4 | 25,7 | 22,5 |
| Tempo de consumo de cigarros (anos) | 35,15 ± 11,8 | 39,4 ± 9,8 | 32,2 ± 13,9 |
| Cessação do tabagismo | 0 | 17 | 19 |
| Cessação da ingestão de bebidas alcoólicas | 0 | 21 | 21 |

*F= Feminino e M= Masculino

Os locais de incidência das lesões e o estadiamento clínico estão na Tabela 2. No entanto, alguns casos não apresentavam estadiamento completo até o momento da análise dos dados e estão mencionados como não avaliados.

Tabela 2 – Localização intra-bucal e estadiamento clínico (TNM) dos grupos 2 e 3

| Descritor | Especificação | Grupo 2 | Grupo 3 |
|---|--------------------|---------|---------|
| Localização Intra-bucal | Língua | 13 | 06 |
| | Soalho | 03 | 08 |
| | Palato | 09 | 03 |
| | Rebordo | 0 | 03 |
| | Gengiva | 0 | 02 |
| | Trígono Retromolar | 01 | 0 |
| Tamanho do Tumor primário (TNM*) | T4 | 17 | 09 |
| | T3 | 02 | 01 |
| | T2 | 04 | 02 |
| | T1 | 0 | 04 |
| | TX | 01 | 0 |
| | Não avaliados | 02 | 06 |
| Linfonodos regionais envolvidos (TNM*) | N0 | 05 | 06 |
| | N1 | 02 | 02 |
| | N2 | 12 | 05 |
| | N3 | 04 | 03 |
| | NX | 01 | 01 |
| | Não avaliados | 02 | 05 |
| Metástase à distância (TNM*) | M0 | 06 | 08 |
| | M1 | 03 | 0 |
| | MX | 13 | 06 |
| | Não avaliados | 04 | 08 |

*TNM: onde T= tamanho do tumor; N = metástase em linfonodo regional; M = metástase à distância

O local de seleção para coleta do grupo de tabagistas crônicos foi: 13 casos de língua e 13 de soalho bucal.

A associação das variáveis relacionadas à iniciação da carcinogênese bucal e os dados clinicopatológicos dos grupos foram correlacionados com a expressão da survivina pelo teste de exato de Fisher ($\alpha=5\%$) (Tabela 3). Nesta avaliação estatística há comparação de apenas duas variáveis, portanto os resultados precisaram ser agrupados. Desta forma, foram constituídos dois grupos a partir da média de tamanho do tumor primário, carga tabágica e tempo de cessação do tabagismo. Esta associação foi estabelecida com a presença da variável analisada, ou seja, a positividade da proteína survivina. Por este motivo o número total de cada variável não corresponde ao número total de casos inicial.

A avaliação de metástases a distância não pode ser realizada devido ao grande número de casos MX.

Os escores 0, 1 e 2 foram agrupados como baixa extensão e os escores 3 e 4 como alta extensão de positividade para survivina nas células dos esfregaços.

Para intensidade, os escores 0 e 1 foram considerados baixa intensidade e os escores 2 e 3 alta intensidade.

Tabela 3 – Expressão da survivina e achados clinicopatológicos dos grupos tabagistas, CCE e pós-cirurgia de remoção de CCE intra-bucal

| Grupo | Variável | | Expressão | | p-valor | Expressão | | p-valor |
|-----------------|-------------------|--------|-----------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| | | | Extensão | | | Intensidade | | |
| | | | Baixa | Alta | | Baixa | Alta | |
| 1 | Carga | Média | 9 | 8 | | 3 | 14 | |
| | tabágica | Alta | 6 | 3 | 0,682 | 0 | 9 | 0,529 |
| 2 | Carga | Média | 3 | 12 | | 8 | 7 | |
| | tabágica | Alta | 1 | 5 | 1 | 1 | 5 | 0,18 |
| | Tempo de cessação | < 6 | 1 | 7 | | 1 | 8 | |
| | tabagismo (meses) | ≥ 6 | 6 | 3 | 0,048 | 6 | 2 | 0,015 |
| | Tamanho do | ≤ 2 cm | 2 | 2 | | 2 | 3 | |
| | tumor primário | > 2cm | 9 | 10 | 1 | 7 | 11 | 0,22 |
| | Comprometimento | Sem | 3 | 4 | | 2 | 5 | |
| linfonodo | Com | 8 | 9 | 1 | 7 | 10 | 0,67 | |
| 3 | Carga | Média | 7 | 9 | | 7 | 9 | |
| | tabágica | Alta | 2 | 2 | 1 | 3 | 1 | 0,58 |
| | Tempo de cessação | < 6 | 6 | 2 | | 4 | 4 | |
| | tabagismo (meses) | ≥ 6 | 3 | 8 | 0,07 | 5 | 6 | 1 |
| | Tamanho do tumor | ≤ 2 cm | 5 | 2 | | 5 | 2 | |
| | primário | > 2cm | 4 | 5 | 0,36 | 3 | 6 | 0,31 |
| | Comprometimento | Sem | 3 | 3 | | 3 | 3 | |
| linfonodo | Com | 6 | 3 | 0,62 | 4 | 5 | 1 | |
| Tempo decorrido | ≤ 6 | 10 | 6 | | 8 | 8 | | |
| após cirurgia | > 6 | 1 | 5 | 0,15 | 3 | 3 | 1 | |

*p- valor para teste exato de Fisher e $p < 0,05$. **Número de casos com a expressão positiva da variável avaliada com exclusão dos casos negativos

A Figura 3 ilustra o esfregaço com células positivas para survivina no grupo tabagistas crônicos e CCE.

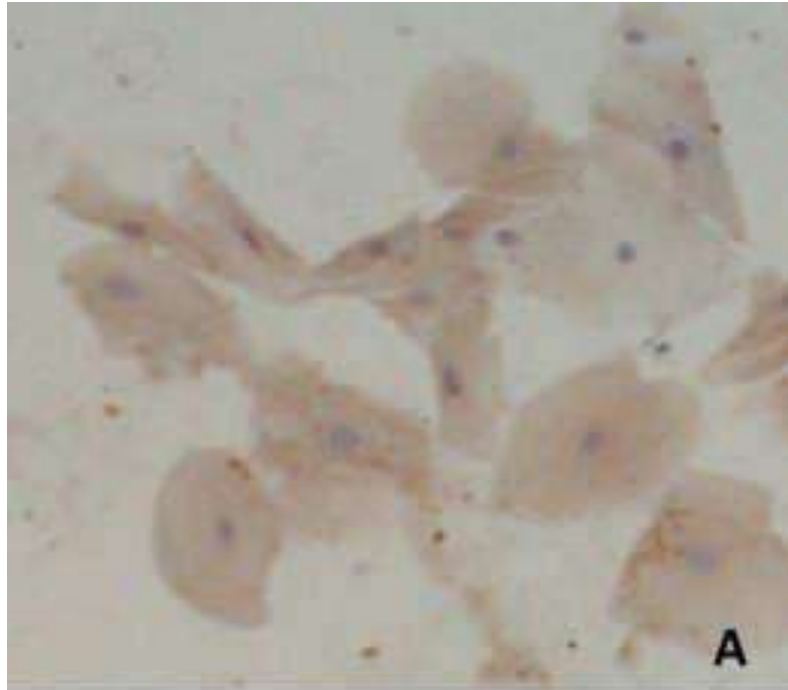


Figura 3 – Expressão da survivina: A: Células sem atipia do grupo tabagista crônico (200x). B: Células com atipia do grupo CCE (400x).

DISCUSSÃO

A survivina é uma proteína anti-apoptótica que tem sido descrita em muitos trabalhos como preditiva de malignidade, e avaliada em diferentes grupos com doenças malignas ou que apresentam potencial de transformação maligna (9, 17, 20, 18, 21). Isto porque é um componente essencial do CPC e pode facilitar a progressão tumoral provendo mecanismos de tolerância ao aumento da instabilidade cromossômica [24].

No presente trabalho a expressão da survivina apresentou os escores de extensão de expressão nos esfregaços mais altos no grupo CCE e pós-cirurgia. Este resultado está de acordo com os apresentados na literatura onde há maior expressão para casos de CCE [17-8].

A extensão da expressão da survivina no grupo pós-cirurgia também foi elevada, e embora sem correlação estatística com o tempo decorrido após remoção do CCE, foi superior em número absoluto nos casos de menor intervalo da cirurgia ao momento da coleta. A utilização da survivina como biomarcador para acompanhamento de recorrências após ressecção cirúrgica também foi avaliada por Lausontornsiri et al. [25] que observaram maior expressão desta proteína nas margens cirúrgicas dos espécimes de CCE bucal em casos de recorrência da doença. No entanto, no presente estudo a avaliação foi realizada no local de remoção prévia do CCE, sem indícios clínicos de recidiva.

A expressão intracelular da survivina foi citoplasmática, exceto para o grupo CCE que apresentou uma pequena

e concomitante expressão citoplasmática e nuclear. O significado da localização intracelular da survivina é muito controverso, sendo que Engels et al. [15] consideram a localização nuclear favorável e a citoplasmática desfavorável, enquanto Qui et al. [14] consideram a survivina citoplasmática citoprotetora. Poomsawat et al. [26] consideram que a survivina citoplasmática sugere a supressão da apoptose em estágios iniciais e tardios da carcinogênese bucal. No estudo apresentado a expressão citoplasmática e nuclear simultânea estiveram associadas a casos com comprometimento de linfonodos regionais, mas esta seria uma conclusão precipitada visto que ocorreram em apenas dois casos.

A expressão nuclear da survivina em amostras histopatológicas de CCE foi observada por Lima et al. [27] em estudo de 42 casos de CCE bucal onde 6 casos apresentaram expressão nuclear exclusiva e 6 casos expressão citoplasmática e nuclear ao mesmo tempo. A localização intracelular da survivina pode ser explicada pelo seu desempenho no controle do ciclo celular, quando localizada no núcleo, e com função anti-apoptótica quando localizada no citoplasma [28].

A avaliação da extensão da expressão da survivina no grupo de tabagistas crônicos mostrou maior incidência para carga tabágica média nos casos de baixa extensão, no entanto, a intensidade de expressão foi maior nos casos com alta carga tabágica. Este achado sugere que já existe uma alteração da apoptose expressa pela proteína survivina que se intensifica com o aumento da carga tabágica. O

aumento da survivina na presença da nicotina, constituinte do tabaco, também foi observado por Zeng et al. [29].

A expressão da survivina no grupo tabagista e nos locais de maior incidência de CCE bucal, língua e soalho bucal, mostra sua participação nos estágios iniciais da carcinogênese. Lodi et al. [22] constataram a presença de RNAm da survivina em mucosa bucal normal, localizadas em gengiva. Lin et al. [30] constataram a presença de survivina citoplasmática foi observada em 97% dos casos de lesões bucais com displasia epitelial.

O efeito do tabagismo também pode ser observado com correlação estatística entre a intensidade da expressão no grupo CCE, onde o maior número de casos de alta intensidade foi observado para o maior tempo de cessação do fumo. A relação do tabagismo com a expressão da survivina foi estudada por Lin et al. [30] em tabagistas com CCE, porém sem correlação significativa, em contraste com Lo Muzio et al. [17] que observaram esta correlação em 55% de casos de CCE bucal. Mais tarde o mesmo grupo, Lo Muzio et al. [31] em um estudo de associação de CCE bucal com o HPV, observaram que o tabaco foi protetor para infecção de HPV.

O tamanho dos tumores e comprometimento de linfonodos regionais não apresentou relação com a expressão da survivina para os grupos CCE em extensão e intensidade e pós-cirurgia em extensão e intensidade. Estes resultados vão de encontro aos de Lo Muzio et al. [17] com maior expressão da survivina em 46 tumores bucais maiores que 1,5cm. Entretanto, os mesmos autores realizaram trabalho em 2003 [18] onde não observaram correlação

entre o tamanho do tumor ou a presença de linfonodos ao avaliar 110 casos de CCE.

A survivina contribuiu para o biomonitoramento dos grupos avaliados quando associada à avaliação do consumo de cigarros, visto que a extensão de sua expressão aumentou do grupo fumante para o CCE, e no grupo pós- cirurgia foi maior nos casos de menor tempo de remoção do CCE. Quanto à intensidade da expressão, foi observada uma diminuição segundo a cessação do consumo de tabaco quando comparamos os grupos CCE e pós-cirurgia, com menor intensidade de expressão, com o grupo tabagista crônico sem lesões na mucosa bucal.

CONCLUSÃO

A intensidade de expressão nos esfregaços citológicos da survivina esteve relacionada à cessação do tabagismo no grupo com CCE bucal. No entanto a carga tabágica não influenciou na expressão da survivina.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva [Internet]. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; [update 2014 Dec 17]. Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/boca/definicao>
2. Rossi BM, Pinho M. Genética e biologia molecular para o cirurgião. São Paulo: Lemar; 1999. p. 57-61.
3. Tessema M, Lehmann U, Kreipe H. Cell cycle and no end. *Virchows Arch.* 2004Apr;444(4):313-23.
4. Nikitatis NG, Sauk JJ, Papanicolaou SI. The role of apoptosis in oral disease: mechanisms; aberrations in neoplastic, autoimmune, infectious, hematologic, and developmental diseases; and therapeutics oportunities. *Oral Surg Orl Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004Apr;97(4):476-90.
5. 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 Feb;156(2): 393-8.
6. Duffy MJ, O'Donovanc N, Brennand DJ, Gallagherd WM, Ryan BM. Survivin: a promising tumor biomarker[review]. *Cancer Lett.* 2007Apr;249(1):49-60.
7. Liston P, Fong WG, Korneluk RG. The inhibitors of apoptosis: there is more life than BCL2. *Oncog.* 2003;22:8568-80. doi:10.1038/sj.onc.1207101

8. Srinvasula SM, Ashwell JD. IAPs: what's in a name? *Molec Cell*. 2008 Apr;30(2):123-35. doi: [10.1016/j.molcel.2008.03.008](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.008)
9. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [abstract]. *Nat Med*. 1997Aug;3(8):917-21.
10. Dubrez-Daloz L, Dupoux A, Cartier J. IAPs: More than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle*. 2008Apr;7(8):1036-46.
11. Lens SMA, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr Opin Cell Biol*. 2006Dec;18(6):616-22.
12. Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. *Clin Cancer Res*. 2008Aug;14(16):5000-05. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-08-0746](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0746).
13. 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*. 2009Jan;135:107-16. doi: [10.1007/s00432-008-0433-z](https://doi.org/10.1007/s00432-008-0433-z).
14. 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*. 2010Apr;46(4):26370. doi:[10.1016/j.oraloncology.2010.01.004](https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.01.004)
15. 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*. 2007Apr;211(5):532-40.

16. Tonini G, Vicenzi B, Santini D, Scarpa S, Vasaturo T, Malacrino C, et al. Nuclear and cytoplasmic expression of survivin in 67 surgically resected pancreatic cancer patients. *Br J Cancer*. 2005Jun;92(12):225-32.
17. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, et al. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2001;70(3):249–54.
18. Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, Staibano S, Mignogna MD, De Rosa G, et al. Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *J Dent Res*. 2003Nov;82(11):923-8.
19. Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Mariggio MA, Procaccini M et al. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2003Dec;89(12):2244-8.
20. 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. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.02.006.
21. 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. *Int J Cancer*. 2007Feb;120(4):942-6.

22. 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 Dis*. 2010Jan;16(1):61-67. doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01614.x.

23. Faria CS, Botelho C, da Silva RM, Ferreira MG. Smoking and abdominal fat in blood donors. *J Bras Pneumol*. 2012May-Jun;38(3):356-363.

24. Vagnarelli P, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: the four dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma*. 2004 Nov;113(5):211-22.

25. Lausoontornsiri W, Chindavijak S, Sangariyavanich E, Sakapiboonnan A. Apoptosis inhibitor showed a significant prognostic marker of relapsed oral cavity cancer after the curative resection surgery. *J Med Assoc Thai*. 2013 Aug;96(8):917-23.

26. Poomsawat S, Punyasingh J, Vejchapipat P. Overexpression of survivin and caspase 3 in oral carcinogenesis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014 Jan;22(1):65-71. doi: 10.1097/PAI.0b013e31828a0d0c

27. Lima CF. Expressão da survivina em diferentes condições relacionadas às etapas da carcinogênese humana intra-bucal (tese). São José dos Campos: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP-Univ Estadual Paulista;2010.

28. Li F, Yang J, Ramnath N, Jaule MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression. of survivin: what is the significance? *Int J Cancer*. 2005Apr;114(4):509-12.
29. Zeng F, Li YC, Chen G, Zhang YK, Wang YK, Zhou SQ, et al. Nicotine inhibits cisplatin-induced apoptosis in NCI-H446 cells. *Med Oncol*. 2012 Mar;29(1):364-73. doi: 10.1007/s12032-010-9792-9
30. 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.
31. LoMuzio 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*. 2005Jul;115(5): 717-23.

ANEXO A - Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Jd. São Dumas
CEP 12201-970 - F. (12) 3947-9028
Fax: (12) 3947-9010 / janete@fojic.unesp.br



CERTIFICADO Comitê de Ética em Pesquisa Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **062/2011-PH/CEP**, referente ao Projeto intitulado “**Expressão da proteína survivina na citologia esfoliativa em carcinomas de células escamosas intra-buciais**”, sob a responsabilidade de **JANETE DIAS ALMEIDA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com 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 setembro de 2011.


Profa. Assist. Dra. **DENISE NICODEMO**
Vice-Coordenadora

APÊNDICE A – Ficha de coleta sobre “Estudo comparativo da expressão da survivina nacidologia esfoliativa da mucosa bucal de pacientes com carcinoma de células escamosas intra-bucal e fumantes crônicos”

Nome:.....
Sexo: Cor: Idade:..... Data de Nascimento:/...../.....
Residência:.....
Bairro..... Cidade..... Estado..... Fone.....
Profissão:.....
Estadiamento TNM:
Local da lesão:.....
Data da cirurgia:.....

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.....

.....

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