JULIANA LUCENA SCHUSSEL

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS SURVIVINA E β -CATENINA EM QUEILITE ACTÍNICA E
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**

São Paulo

2007

Juliana Lucena Schussel

**Avaliação da expressão imunoistoquímica das proteínas
survivina e β -catenina em queilite actínica e carcinoma epidermóide
de lábio**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração em Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins

São Paulo
2007

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Schussel, Juliana Lucena

Avaliação da expressão imunoistoquímica das proteínas survivina e β -catenina em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio / Juliana Lucena Schussel; orientador Marília Trierveiler Martins. -- São Paulo, 2007.

62p.: tab., fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal) -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Queilite 2. Carcinoma de células escamosas – Lábio 3. Proteína survivina – Expressão imunoistoquímica – Avaliação 4. Beta-Catenina – Expressão imunoistoquímica - Avaliação

CDD 617.63
BLACK D61

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail:

FOLHA DE APROVAÇÃO

Schussel, JL. Avaliação da expressão imunoistoquímica das proteínas survivina e β -catenina em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

São Paulo, 22 de junho de 2007.

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

2) Prof(a). Dr(a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

3) Prof(a). Dr(a)._____

Titulação:_____

Julgamento:_____Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Ao Bruno, por todos os momentos que ele abdicou em meu favor, por seu apoio e companheirismo, por seu carinho e seu amor.

Aos meus pais, Zulma e Ricardo, que sempre me apoiaram na minha vida e na minha carreira, lutaram junto neste caminho e são os grandes responsáveis pelas minhas conquistas.

Às minha irmãs, Carolina e Sílvia, minhas grandes amigas e incentivadoras.

À Beth e ao Pompílio, que me acolheram em sua casa e tornaram meus momentos longe de casa mais suaves e alegres, não tenho palavras para agradecer o carinho de vocês!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Marília Trierveiler Martins, pela sua dedicação, incentivo, compreensão com que me orientou na realização do seu trabalho.

Aos Professores da pós-graduação pelo convívio, disponibilidade e ensinamentos.

Aos meus amigos Paulo, Renata, Thaís, Alexandra pelo companheirismo e pelos momentos de descontração, que tornam a vida mais leve.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação pela agradável convivência e espírito de companheirismo e ajuda nos momentos em que precisei.

Ao Dr. Sassi, exemplo de pessoa e profissional, um grande entusiasta da profissão e da pesquisa, com quem muito aprendi e espero continuar aprendendo. Trabalhar com o senhor é uma experiência gratificante, engrandecedora e enriquecedora.

Às funcionárias, Elisa, Zilda, Néia, Nair e Bia pela amizade, disponibilidade, paciência e competência.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos

Agradeço a todos que, de alguma forma participaram da elaboração deste trabalho e colaboraram com ele, e a todos aqueles que me ensinaram a prosseguir sempre.

Quase...

Ainda pior que a convicção do não e a incerteza do talvez é a
desilusão de um quase.

É o quase que me incomoda, que me entristece, que me mata
trazendo tudo que poderia ter sido e não foi.

Quem quase ganhou ainda joga, quem quase passou ainda estuda,
quem quase morreu está vivo, quem quase amou não amou.

Basta pensar nas oportunidades que escaparam pelos dedos, nas
chances que se perdem por medo, nas idéias que nunca sairão do
papel por essa maldita mania de viver no outono.

Pergunto-me, às vezes, o que nos leva a escolher uma vida
morna; ou melhor não me pergunto, contesto.

A resposta eu sei de cor, está estampada na distância e frieza dos
sorrisos, na frouxidão dos abraços, na indiferença dos "Bom dia",
quase que sussurrados.

Sobra covardia e falta coragem até pra ser feliz.

A paixão queima, o amor enlouquece, o desejo trai.

Talvez esses fossem bons motivos para decidir entre a alegria e a dor,
sentir o nada, mas não são.

Se a virtude estivesse mesmo no meio termo, o mar não teria ondas, os
dias seriam nublados e o arco-íris em tons de cinza.

O nada não ilumina, não inspira, não aflige nem acalma, apenas
amplia o vazio que cada um traz dentro de si.

Não é que fé mova montanhas, nem que todas as estrelas estejam ao
alcance, para as coisas que não podem ser mudadas resta-nos somente
paciência porém, preferir a derrota prévia à dúvida da vitória é

desperdiçar a oportunidade de merecer.
Pros erros há perdão; pros fracassos, chance; pros amores
impossíveis, tempo.
De nada adianta cercar um coração vazio ou economizar alma.
Um romance cujo fim é instantâneo ou indolor não é romance.
Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo
impeça de tentar.
Desconfie do destino e acredite em você.
Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando,
vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo,
quem quase vive já morreu."

Luiz Fernando Veríssimo

Schussel, JL. Avaliação da expressão imunoistoquímica das proteínas survivina e β -catenina em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

RESUMO

A queilite actínica é uma lesão causada pela exposição excessiva aos raios ultra-violeta (UV). Atingindo mais homens a partir da 5ª década de vida e de pele clara, possuindo grande potencial de malignização, quando originará o carcinoma epidermóide de lábio, a malignidade mais comum em boca. Seu diagnóstico na maioria das vezes é tardio e quando isto ocorre sua taxa de sobrevida é de apenas 5 anos. O processo de progressão da carcinogênese está relacionado com a quebra no balanço entre os processos de proliferação/diferenciação celular e apoptose. A survivina é uma proteína com importantes funções na inibição da apoptose e progressão da mitose. Sua expressão desregulada, presente na maioria dos cânceres humanos, está relacionada a um prognóstico pobre e uma diminuição na sobrevida dos pacientes. Acredita-se que ela participe de eventos chaves na carcinogênese. Pode ser gene alvo da β -catenina, uma proteína de adesão com funções de transcrição relacionada com a via Wnt. A β -catenina presente nas junções aderentes da membrana celular junto com a caderina- E, quando livre no citoplasma é translocada para o núcleo onde faz a transcrição de gens reguladores do ciclo celular. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imunoistoquímica da survivina e β -catenina nas lesões de queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio, e relacionar a expressão das duas proteínas e a participação na carcinogênese dessa lesão. Além disso, as lesões de queilite actínica foram classificadas quanto às alterações morfológicas por duas classificações: a proposta

pela OMS, 2005 e por um sistema binário de graduação proposto por Kujan et al. em 2006. Foram realizadas reações de imunoistoquímica para verificação da expressão das duas proteínas. Os resultados mostraram, para β -catenina, expressão de membrana em todos os casos e marcação citoplasmática em 85% os casos de queilite actínica e marcação nuclear em 22%. A survivina foi positiva em 42% dos casos de queilite, com padrão de marcação irregular. Os carcinomas epidermóides foram positivos em 83% dos casos para β -catenina e nenhum deles teve marcação nuclear, e foram 100% positivos para survivina. Os resultados mostram alterações nas lesões de displasia, evidenciando o potencial maligno. Mais estudos são necessários para relacionar a expressão das duas proteínas e para esclarecer o papel da survivina na carcinogênese das lesões de lábio.

Palavras- Chave: Queilite actínica; Carcinoma epidermóide de lábio; Survivina; β -catenina.

Schussel, JL. Evaluation of the immunohistochemical expression of the survivin and β -catenin proteins in actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2007.

ABSTRACT

The actinic cheilitis is caused by excessive exposure to ultra violet (UV) radiation, most common in men after the 5^o decade and fair skin, it has a great potencial of malignization, when it will become the squamous cell carcinoma of the lip, the malignancy most frequent in the mouth. The diagnosis is late in most cases which leads to a decrease of the survival to only 5 years. The progression of carcinogenesis is related to the balance between cell proliferation/ differentiation and apoptosis. Survivin is a protein with important functions on the inhibition of apoptosis and progression of mitosis. It's desregulated expression, present in most human cancers, is related to a poor prognosis and a decrease of overall survival. Many authors believe that it participates and is key event on early carcinogenesis. Survivin might be a target gene of β -catenin, that is a adhesion protein with transcription functions related with the Wnt pathway. β -catenin is present in the adherens junctions of the cellular membrane in complex with the E-cadherin, and when free on the cytoplasm, it's translocated to the nucleus, where it's responsible for the transcription of cell-cycle regulators genes. The aim of the study was to evaluate the immunohystochemical expression of survivin and β -catenin in actinic cheilitis and squamous cell carcinoma lesions, and correlate the expression of the two proteins and the participation on the carcinogenesis of this lesion. Besides, the actinic cheilitis samples were classified as the epithelial changes by two methods: one proposed by the World Health Organization (WHO), in 2005 and the other, a binary system of

graduation proposed by Kujan et al. in 2006. The results showed, for the β -catenin, membrane expression in all cases, and cytoplasmatic staining in 85% of the actinic cheilitis lesions, and 22% of nuclear staining. Survivin was positive in 42% of the actinic cheilitis, with an irregular pattern of staining. The squamous cell carcinomas were positives in 83% for β -catenin and none of them had nuclear staining, and were a 100% positive for survivin. The results showed alterations on the dysplasic lesions, proving their malignant potencial. More studies are needed to correlated the expression of the two proteins and to elucidate the role of survivin in the carcinogenesis of lip lesions.

Keywords: Actinic cheilitis; Squamous cell carcinoma of the lip; Survivin; β -catenin

SUMÁRIO

	p.
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 Radiação Ultra-Violeta.....	15
2.2 Queilite Actínica.....	17
2.3 Carcinoma Epidermóide de Lábio.....	19
2.4 Survivina.....	21
2.5 β -catenina.....	25
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Análise Morfológica.....	30
4.2 Reação de imunoistoquímica.....	32
4.3 Análise dos Resultados.....	34
5 RESULTADOS.....	35
5.1 Classificação das displasia.....	35
5.2 Expressão Imunoistoquímica da survivina.....	39
5.3 Expressão Imunoistoquímica da β -catenina.....	41
6 DISCUSSÃO.....	46
7 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO.....	62

1 INTRODUÇÃO

O processo de carcinogênese se dá por uma combinação de fatores iniciadores e promotores. No caso da radiação ultra-violeta (UV), sabemos que ela pode funcionar tanto como iniciador, como promotor do câncer (LEFFELL, 2000). Prova disso, alterações causadas pela exposição crônica à radiação UV, encontradas no carcinoma de pele já instalado, podem também ser demonstradas na sua lesão inicial de queratose actínica.

O carcinoma epidermóide de lábio e a queilite actínica são lesões que ocorrem em lábio, apresentam características semelhantes às lesões em pele e compartilham o mesmo agente etiológico. É a localização mais freqüente do câncer de boca e em estágios avançados pode apresentar uma sobrevida menor que 5 anos. A lesão de queilite actínica instalada após a exposição crônica à radiação UV, possui um alto índice de transformação entre as lesões consideradas potencialmente malignas em boca. Conseguir definir quais lesões tornar-se-ão carcinomas é essencial para prevenir o câncer de boca, garantir a cura, diminuir a morbidade de tratamentos mais agressivos e proporcionar mais qualidade de vida aos pacientes.

A survivina é um membro da família das proteínas inibidoras de apoptose (IAP), presente em tecido fetal, mas não detectável em tecidos adultos sadios diferenciados (LO MUZIO et al., 2005). A descoberta da survivina, expressada em vários cânceres humanos e também em lesões cancerizáveis de pele, pode estar associada a um evento precoce na carcinogênese, fazendo dela um interessante alvo para terapias anti-câncer (GROSSMAN et al., 2001). A literatura mostra sua

expressão relacionada a um pior prognóstico da doença e menor tempo de sobrevida. A associação da expressão desta proteína com diferentes graus de displasia da queilite actínica pode auxiliar na conduta clínica frente esta lesão, servindo como importante marcador na prevenção do câncer de lábio.

Para melhor entender como se dá a desregulação da expressão da survivina no câncer, vamos abordar também neste estudo a expressão da proteína β -catenina que é uma proteína de adesão que possui também função de transcrição e tem a survivina como um dos seus genes alvos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Radiação Ultra-Violeta (UV)

A radiação UV é o fator etiológico mais relevante para a ocorrência das neoplasias de pele e de lábio (HORTA et al., 2007). Ela é dividida em 3 seções de acordo com o comprimento de onda, e possuem efeitos biológicos distintos. A radiação UVA (320-400 nm), é a radiação predominante, e é principalmente associada a efeitos sobre envelhecimento e formação de rugas, com pouco potencial carcinogênico. A radiação UVB (280-320 nm) é amplamente absorvida pela pele e pode causar eritema, queimaduras e câncer. A radiação UVC (200-280 nm) é bloqueada pela camada de ozônio e não possui nenhum efeito relatado sobre os seres humanos (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

Os primeiros efeitos da radiação UV na pele após a exposição são eritema (inflamação por queimadura solar) e bronzeamento (aumento da melanogênese). O bronzeamento produz uma proteção para nucléolo contra a radiação UV, levando a uma redução dos danos do DNA. Após 24 – 48 horas ocorre um aumento da atividade mitótica e da síntese de DNA e RNA. A exposição solar prolongada leva a deterioração de estrutura e função tecidual com acúmulo de danos ao DNA (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004).

A exposição aos raios UV causa lesões mutagênicas do DNA que são como assinaturas características. As mais freqüentes são dímeros de ciclobutanos de pirimidinas (CPDs) e fotoprodutos de pirimidinas 6-4 (NISHIGORI, 2006; PFEIFER,

YOU; BESARATINIA, 2005). O acúmulo de mutações gênicas favorece a carcinogênese e pode ser considerado responsável pelo câncer de pele. Mesmo lesões com potencial de malignização como a queratose actínica, apresentam alterações genéticas (NISHIGORI, 2006). As alterações ocorridas no DNA de células da epiderme suprimem seletivamente o sistema imune e enfraquecem o funcionamento normal dos mecanismos de reparo celular (DE VISSCHER; VAN DER WAAL, 1998).

Algumas mutações gênicas provocadas pelos fotoprodutos da radiação UV não são reparadas antes da replicação do DNA. Dependendo da lesão ocorrida no DNA uma ou mais vias de reparo são ativadas, e quando estas vias falham, as células podem abrir mão de outros mecanismos como interrupção do ciclo celular e apoptose para impedir a perpetuação da mutação (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004). O gene p53 tem papel fundamental no controle de células anormais pós radiação UV (LEFFELL, 2000), provocando uma parada do ciclo celular para permitir o reparo do DNA ou levando a célula à apoptose quando o danos ao DNA são muito severos (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; PFEIFER, YOU; BESARATINIA, 2005). Porém mutações deste gene são encontradas em 90% dos carcinomas epidermóides e suas alterações inibem a apoptose, aumentando a proliferação celular, que pode levar a uma hiperplasia tecidual (LEFFELL, 2000).

A radiação UV não só transforma as células induzindo as mutações, como também interfere com a imunidade do hospedeiro contra o desenvolvimento do carcinoma de pele (NISHIGORI, 2006). A inflamação crônica causada pela exposição solar tem efeito imunossupressivo. Segundo a Organização Mundial de Saúde pessoas imunossuprimidas apresentam maior incidência de carcinomas

epidermóides que a população em geral (WHO, 2007). A exposição a níveis ambientais à radiação UV altera a atividade e distribuição de algumas células responsáveis por iniciar a resposta imune em humanos.

2.2 Queilite Actínica

A queilite actínica é uma lesão que ocorre nos lábios causada por exposição excessiva aos raios ultra-violeta (UV) (MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004; MARTINEZ et al., 2005; REGEZI; SCIUBBA, 1991), quer seja do sol ou de fontes artificiais, resultando na degeneração tecidual acelerada (REGEZI; SCIUBBA, 1991). O lábio inferior é o mais atingido (MARTINEZ et al., 2005), por sua localização, que lhe confere menos proteção à exposição solar, e por possuir um epitélio mais delgado que do lábio superior (MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004). Nesse último, a ocorrência é de apenas 2 a 8% dos casos (PARISE Jr, 2000). Clinicamente inicia-se como uma lesão branca ou queratótica, vermelha, ou mista, localizada ou difusa por toda a extensão do lábio, e assintomática, com alguns episódios de desconforto. Podem ser crônicas - quando a exposição solar é freqüente - ou aguda, podendo regredir espontaneamente uma vez cessada a exposição. Na evolução da queilite actínica crônica, ocorre fissuração, descamação, enrugamento do lábio e a junção mucocutânea, entre o lábio e a pele adjacente, se torna difusa (REGEZI; SCIUBBA, 1991). Pode formar bolhas e ulcerações persistentes, além de sangramentos espontâneos, com sintomatologia dolorosa. O índice de progressão para carcinoma epidermóide de

lábio é de 10 a 20% dos casos (SANTOS et al., 2003). O principal fator para a transformação maligna são as displasias.

Há uma grande preferência pelo sexo masculino na proporção de 10:1, com faixa etária acima dos 50 anos (NEVILLE et al., 2004). Está relacionado com a queratose actínica que ocorre em pele também pela exposição solar, compartilhando seu fator etiológico e aspectos de sua evolução (DE VISSCHER; VAN DER WAAL, 1998). Estudos de seguimento de pacientes têm relatado tempo de evolução para o carcinoma epidermóide, induzida pelo sol, o período de 20 a 30 anos, ou menos, em alguns casos (KAUGARS et al., 1999).

Pessoas de pele clara são as mais acometidas. Segundo Yamaguchi et al., (2006), os níveis de melanina estão inversamente relacionados aos danos ao DNA causados por radiação UV. A apoptose induzida pela radiação UV é maior em peles mais escuras e as células danificadas são mais eficientemente removidas da epiderme. Pessoas de pele clara possuem menor potencial de reparo das células com alterações genéticas conseqüentes a radiação UV (YAMAGUCHI et al., 2006).

Histologicamente pode apresentar epitélio com áreas de acantose e outras de atrofia. Apresenta aumento variado da camada de queratina (ROJAS et al., 2004) e diferentes graus de displasia epitelial. No tecido conjuntivo, a radiação UV induz à alteração das fibras de colágeno e elastina, levando a uma degeneração das mesmas, chamada de elastose solar. Nas lesões agudas, todas as mudanças histológicas são temporárias e com a interrupção da exposição, as células retornam ao seu estado normal em 7 - 15 dias (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004). A biópsia é justificada quando há um aumento na queratose, endurecimento da base ou ulceração (MAIN; PAVONE, 1994).

2.3 Carcinoma Epidermóide de Lábio

Depois das lesões não melanomas de pele, o câncer de lábio é a neoplasia maligna mais comum em cabeça e pescoço, e corresponde a 30% das neoplasias malignas de boca (VUKADINOVIC et al., 2007; ZITSCH et al., 1995). É classificado como carcinoma de cavidade oral, mas sua localização e seu epitélio diferenciado lhe conferem características próprias e comuns às neoplasias não-melanoma de pele (DE VISSCHER; VAN DER WAAL, 1998; HORTA et al., 2007). O principal grupo de risco inclui pessoas de pele clara com pouca capacidade de bronzeamento e que apresentam eritema após a exposição solar. O câncer de lábio é até trinta vezes mais comum em pessoas de pele clara do que em pessoas negras (DE VISSCHER; VAN DER WAAL, 1998). Acomete principalmente homens nas 7ª e 8ª décadas de vida (DE VISSCHER; VAN DER WAAL, 1998; HJORTDAL; NAESS; BERNER, 1995; KÜBLER et al., 2001; SALGARELLI et al., 2005; VUKADINOVIC et al., 2007).

Cerca de 95% dos casos de câncer de lábio correspondem ao carcinoma epidermóide, os demais podem incluir neoplasias de glândulas salivares, carcinoma basocelular e outras neoplasias raras (KÜBLER et al., 2001).

Apesar de sua localização ser de fácil visualização, a lesão indolor leva a uma demora na busca por um profissional e a grande parte das lesões são diagnosticadas com aproximadamente 1,5cm (KAUGARS et al., 1999), levando a uma diminuição na média de sobrevida desses pacientes (ROJAS et al., 2005). Clinicamente são ulcerações que não cicatrizam, com bordas elevadas e

endurecidas que, à palpação, tem-se a sensação de passar os dedos em areia com luvas. Seu crescimento e invasão são locais, mas podem atingir estruturas adjacentes. Suas características clínicas permitem um diagnóstico clínico precoce que normalmente é compatível com o diagnóstico histopatológico. Metástases linfonodais não são comuns e podem ocorrer de 5 a 10% dos casos, sua incidência varia de acordo com o grau de diferenciação e estágio patológico; tumores indiferenciados apresentam metástase em até 35% dos casos, diminuindo a sobrevida em até 50% (CASINO et al., 2006). Seu prognóstico é favorável quando detectado precocemente. De acordo com Gooris et al. (2001) a presença e a extensão do envolvimento de linfonodos regionais é considerado o fator prognóstico mais importante para determinar a sobrevida do paciente. Além disso deve se levar em consideração o tamanho da lesão, sua graduação clínica, localização e a presença de história de recorrência (ZITSCH et al., 1995). Para lesões com menos de 2 cm, 90% de cura são esperadas, e seu índice de sobrevida é maior que a média dos carcinomas de cavidade oral. Apesar de seu alto índice de cura em relação a outras neoplasias de cabeça e pescoço, estudos mostram recidivas em 5 – 20% dos casos e mortalidade em 5 – 10% (SALGARELLI et al., 2005, VUKADINOVIC et al., 2007).

O tratamento de escolha é cirúrgico, mas a radioterapia também apresenta resultados favoráveis, principalmente se levando em conta fatores estéticos e funcionais. O esvaziamento cervical pode ser realizado quando há suspeita de possíveis linfonodos metastáticos não identificáveis (SALGARELLI et al., 2005, VUKADINOVIC et al., 2007). Algumas seqüelas podem permanecer após o tratamento, como diminuição da abertura bucal e da elasticidade do lábio, no caso

de cirurgia e xerostomia quando o tratamento inclui radioterapia, que acaba atingindo as glândulas salivares da área irradiada (SALGARELLI et al., 2005).

2.4 Survivina

A apoptose é um programa de suicídio celular fisiológico crítico para o desenvolvimento e manutenção dos tecidos saudáveis (ALTIERI, 2003b; LO MUZIO et al., 2005). A desregulação nas vias de morte celular ocorre no câncer, doenças auto-imunes e imunodeficiências, e após episódios de isquemia e desordens neuro-degenerativas (FULDA; DEBATIN, 2006). O processo de apoptose envolve cascatas de famílias de genes, vias de sinalização e microambientes subcelulares especializados que respondem aos estímulos de morte celular ou à quebra de substratos envolvidos no reparo de DNA, organização do citoesqueleto, integridade nuclear e sobrevivência celular (ALTIERI, 2003b).

A importância da apoptose destaca-se já no desenvolvimento embrionário e fetal, e mantém a homeostasia em tecidos adultos fazendo um equilíbrio entre proliferação e morte celular (ALTIERI, 2003b; SATOH et al., 2001).

Nos mamíferos, existem duas vias de apoptose: a via intrínseca que resulta em um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial e colapso de suas funções liberando Ca^{2+} , oxigênio reativo e proteínas que facilitam a atividade das caspases; e a via extrínseca, que se inicia pela ligação de receptores de superfície de morte celular, como $\text{TNF}\alpha$ (Fator de Necrose Tumoral) e CD95 (Fas), para seleção imune e inflamação (DEVERAUX; REED, 1999; FULDA; DEBATIN, 2006).

Duas famílias de genes regulam a apoptose: a BCL2 e a IAP. A família BCL2 possui moléculas pró e anti apoptóticas – BAX, BAD, BAK, BID e Bcl2 e BclX respectivamente - relacionadas com a via intrínseca mitocondrial, na liberação do citocromo c.

As proteínas inibidoras de apoptose (IAP) agem *downstream* na cascata da caspases. Possuem de 1 a 3 cópias de ~70 aminoácidos com um braço de zinco designado repetição do baculovírus IAP (BIR). Algumas apresentam um domínio de recrutamento de caspase (CARD) e uma terminação carboxi *RING finger* – um pequeno domínio de ligação de zinco encontrado em várias proteínas com funções distintas que podem funcionar como proteínas ligases de ubiquitina E3 (ALTIERI, 2004; FULDA; DEBATIN, 2006; LI, 2003; WILSON et al., 2002). As IAPs agem principalmente como inibidores endógenos das caspases após se ligarem com proteínas liberadas pela mitocôndria, como a SMAC/ DIABLO. Essas moléculas inibem várias formas de apoptose induzidas por fator de necrose tumoral α , caspases, drogas quimioterápicas, infecções virais e estresses oxidativos, potencialmente por suprimir diretamente a atividade das caspases terminais 3 e 7 (LI, 2003; LO MUZIO et al., 2005). Ainda, algumas IAPs funcionam como reguladores essenciais da divisão celular (GROSSMAN et al., 2001; LI, 2003; YAMAMOTO; TANIGAWA, 2001).

A survivina foi descoberta recentemente e é a menor proteína desta família (16,5 kDA) (AMBROSINI; ADIDA; ALTIERI, 1997). Possui apenas um domínio BIR e nenhum *RING finger*. Além de função inibidora da apoptose, a survivina tem, também, importante papel na divisão celular, estando presente na fase G₂/M, na organização dos fusos mitóticos (YAMAMOTO; TANIGAWA, 2001; LI, 2003) . Na intérfase, é, então, degradada via ubiquitinização e destruição proteossomal

(ALTIERI, 2003b). Estudos mostram sua atividade como uma ação entre o maquinário de apoptose e pontos de checagem que controlam a progressão da mitose (DEVERAUX; REED, 1999).

Sua expressão é verificada em tecidos fetais e indiferenciados e já foi também verificada em várias neoplasias malignas humanas como carcinoma de pulmão, mama, cólon, estômago, fígado, esôfago, pâncreas, útero e ovário, e leucemias, sarcomas de tecidos moles, e carcinomas de pele melanomas e não-melanomas (ALTIERI, 2003a; KIM et al., 2003; LI, 2003; SATOH et al., 2001).

Altos níveis de survivina foram relacionados com pior curso no neuroblastoma, redução da sobrevida no câncer colorretal, câncer de pulmão de células não pequenas, câncer de mama e aumento nas taxas de recorrência em câncer de bexiga. Sua expressão foi verificada em 80% dos cânceres de boca e relacionada com fenótipo mais agressivo da doença (LO MUZIO et al., 2005).

Acredita-se que a inibição da apoptose induzida pela survivina favorece o crescimento e progressão tumoral, induzindo estímulos e mantendo uma progressão mitótica apropriada das células neoplásicas. A superexpressão da survivina provoca progressão aberrante da mitose com aparecimento de centrossomos supranumerários, formação de fusos mitóticos multipolares, falha na citocinese e geração de células multinucleadas. (ALTIERI, 2003a)

Os mecanismos moleculares sobre a regulação da survivina no câncer são complexos e não bem elucidados. Várias lesões moleculares associadas ao câncer foram implicadas na potencial desregulação da expressão do gene survivina, incluindo a amplificação do locus 17q25 em neuroblastomas, desmetilação do exon 1 da survivina no câncer de ovário, quebra da via RB/E2F e perda do tipo nativo de p53 (JIANG et al., 2004).

A via Wnt, com função de proliferação e diferenciação celular, também foi implicada na formação de cânceres humanos e pode envolver a mutação da β -catenina, APC ou axina. Essas mutações levam à estabilização aberrante da β -catenina, sua acumulação e translocação para o núcleo e ativação transcricional de genes. Recentemente, foi mostrado que a survivina é um gene alvo da β -catenina, que pode ter um mecanismo de regulação da survivina (HUANG et al., 2006).

A expressão desregulada da survivina, induzida pelo complexo de transcrição β -catenina/*T cell factor* (TCF), rompe o equilíbrio entre proliferação/ diferenciação celular e apoptose, e sua inibição pode levar a diminuição aberrante da morte celular (HUANG et al., 2006). Além do complexo de transcrição β -catenina/TCF, outros estudos mostram que membros da família Sp/KLF, que atuam no processo de transcrição celular, também podem promover a expressão do gene da survivina (ZHU et al., 2006).

Ainda, reduções na expressão da survivina adquirida usando estratégias *antisense* levaram à apoptose e à sensibilização à drogas anticâncer, ao menos em algumas linhas celulares tumorais, implicando a survivina como importante agente na sobrevivência celular e quimioresistência (ALTIERI, 2003b ; KIM et al., 2003). Dessa maneira, a survivina pode ser de significância prognóstica para pacientes com alguns tipos de câncer. Estudos sugerem que, a detecção da survivina por reações imunoistoquímicas ou por reação em cadeia da polimerase em tempo real (*Real Time- Polymerase Chain Reaction* - RT-PCR), deve ser seguida de protocolo de acompanhamento e terapias alternativas (ALTIERI, 2003b).

A maioria das neoplasias humanas apresenta grande expressão de survivina, sugerindo que a reativação do gene da survivina ocorra freqüentemente durante a

carcinogênese e progressão maligna. Doenças inflamatórias também apresentam aumento na expressão de survivina (ALTZNAUER et al., 2004).

2.5 β -catenina

A β -catenina foi inicialmente identificada por sua associação com as caderinas na adesão celular mediada por Ca^{2++} , nas junções aderentes. Ela pertence à superfamília *Armadillo*, que são proteínas com domínio central comum com 12 seqüências de repetição de 42 resíduos de aminoácidos que interagem com diversas proteínas, como as caderinas, *adenomatous polyposis coli* (APC), e *T cell factor/ Lymphoid enhancing factor* (TCF/LEF) (JAMES NELSON; NUSSE, 2004; MIGUEL; AMORIN, 2004; WILLERT; NUSSE, 1998). Esta vasta possibilidade de interação com diversos elementos faz da β -catenina uma proteína versátil com funções estruturais e sinalizadoras.

Sua função estrutural está relacionada com a adesão celular junto com a caderina E, nas junções aderentes. As junções aderentes são complexos multiproteicos formados por moléculas de adesão cálcio-dependente, chamadas caderinas. As caderinas, por sua vez, são uma família de glicoproteínas transmembrana divididas em 10 subclasses de acordo com sua especificidade imunológica e distribuição tecidual. A caderina E, identificada nos tecidos epiteliais, tem papel fundamental na manutenção da integridade do epitélio (LYAKHOVITSKY et al., 2004). A β -catenina se liga à porção citoplasmática da caderina E, formando o complexo caderina E/ β -catenina, que se liga à α -catenina, e aos microfilamentos de

actina do citoesqueleto, dessa forma sendo responsáveis pela manutenção da forma e função celular (EL-BAHRAWY et al., 2003).

A expressão alterada das caderinas e das cateninas foi associada com perda de diferenciação, aquisição de fenótipo invasivo, e prognóstico pobre em vários tipos de cânceres (DE AGUIAR et al., 2006; SHIEH et al., 2003). A redução da adesão intercelular nos tumores pode significar um papel importante do complexo caderina E/ β -catenina na carcinogênese humana (LYAKHOVITSKY et al., 2004). De acordo com de Aguiar et al. (2006), correlacionando a expressão de β -catenina com prognóstico de carcinoma epidermóide de boca, a perda da expressão na membrana pode ser considerada como um potencial marcador de recorrência precoce desses tumores.

A função sinalizadora da β -catenina esta relacionada com sua participação na via de sinalização Wnt. A via Wnt é responsável pela transcrição de vários genes controlando diversos aspectos do desenvolvimento embrionário e doenças humanas, incluindo proliferação e diferenciação celular e apoptose (JAMES NELSON; NUSSE, 2004; KARIM et al., 2004; MOON et al., 2002). Na ausência de sinal mitogênico a β -catenina forma um complexo quaternário com o APC, a GSK3 β (glicogênio sintase kinase 3 β) - proteína que promove fosforilação de substratos celulares, na maioria das vezes inibindo-os- e Axina - que funciona como uma ponte, dando proximidade física para interação com outras proteínas -, que leva à sua ubiquitinação e degradação pelo proteossomo (BARKER; CLEVERS, 2000; JAMES NELSON; NUSSE, 2004; KARIM et al., 2004, MIGUEL; AMORIM, 2004). A ativação da via Wnt, através da ligação com as proteínas *Frizzled* e com as proteínas relacionadas ao receptor de lipoproteínas 5 e 6, leva à inativação da

proteína GSK3 β e conseqüente dissolução do complexo de destruição, liberando a β -catenina no citoplasma (JAMES NELSON; NUSSE, 2004).

A estabilização da β -catenina citoplasmática pela via Wnt, leva ao seu acúmulo no núcleo, onde forma complexos com os fatores de transcrição TCF/LEF. Entre os genes transcritos pela β -catenina estão o c-myc e a ciclina D1, importantes reguladores do ciclo celular e genes da família AP1, responsáveis pela proliferação e diferenciação celular, apoptose e transformação oncogênica (KARIM et al., 2004). Esta sinalização nuclear está envolvida na regulação de eventos celulares, no desenvolvimento embrionário e sua ativação aberrante pode contribuir para a progressão do câncer com aumento da proliferação celular (EL- BAHRAWY et al, 2003; JAMES NELSON; NUSSE, 2004).

Estudos realizados por Lyakhovitsky et al. (2004) mostram que diminuição nos níveis de β -catenina ou sua localização anormal estão associados ao avanço de neoplasia epidérmicas *in situ* para carcinomas epidermóides invasivos, mas sem relação com a graduação histológica.

A β -catenina livre no citoplasma ou no núcleo por falha nos mecanismos de fosforilação e degradação, pode estar relacionada com a carcinogênese. O acúmulo nuclear pode ser um iniciador no processo de metástases. A perda da função de adesão permite que as células neoplásicas escapem de seu sítio de origem, degradem a matriz extracelular, adquiram um comportamento invasivo e finalmente gerem metástase (PINTO Jr, 2003).

Tapia et al. (2006) em estudo sobre a proteína quinase caseína2 (CK2), responsável pela fosforilação de mais de 300 proteínas envolvidas em vários processos celulares, demonstraram que a atividade desta proteína promove a

transcrição de survivina pelo complexo β -catenina/TCF, levando a um aumento da sobrevivência celular e inibição da apoptose.

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho é analisar a presença e distribuição, através da reação imunoistoquímica, das proteínas survivina e β -catenina em queilite actínica, com diferentes graus de displasia epitelial, e no carcinoma epidermóide de lábio.

Este trabalho visa também comparar dois métodos de graduação histológica das displasias epiteliais de boca.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 35 casos de lesões de queilite actínica e 12 de carcinoma epidermóide de lábio, pertencentes ao arquivo Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. O material encontrava-se fixado em formol e embocado em parafina.

4.1 Análise Morfológica

Para a análise morfológica das lesões foram utilizados cortes de 5µm corados por hematoxilina e eosina e examinados ao microscópio de luz.

Os critérios analisados foram aqueles sugeridos pela Organização Mundial da Saúde (BARNES et al., 2005). A saber:

A. Arquiteturais:

- estratificação epitelial irregular;
- perda da polaridade das células da camada basal;
- projeções epiteliais em forma de gota;
- aumento do número de figuras de mitose;
- presença de figuras de mitose anormais na metade superior do epitélio (mitoses altas);
- queratinização prematura em células isoladas;
- pérolas de queratina em projeções epiteliais;

B. Citológicos:

- variação anormal de tamanho do núcleo;
- pleomorfismo nuclear;
- variação anormal de tamanho da célula
- pleomorfismo celular
- proporção núcleo/citoplasma aumentada;
- aumento no tamanho do núcleo;
- figuras de mitose anormais;
- número e tamanho de nucléolos aumentados;
- hipercromatismo.

Em cortes não homogêneos, a área selecionada para graduação foi aquela com maior número de alterações. As análises foram realizadas por dois observadores e as alterações foram classificadas em displasia discreta, moderada e intensa conforme proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (BARNES et al., 2005) e em displasia de alto risco e displasia de baixo risco de acordo com o Sistema Binário de graduação de displasias epiteliais proposto por Kujan et al. (2006), para título de comparação das duas classificações.

4.1.1 Classificação proposta pela OMS

- Displasia epitelial discreta: alterações arquiteturais limitadas ao terço basal do epitélio, acompanhado de atipia citológica;

- Displasia epitelial moderada: alterações arquiteturais se estendendo aos dois terços inferiores do epitélio. A análise do grau de atipia citológica pode aumentar o grau de displasia;
- Displasia epitelial intensa: alterações arquiteturais em mais de dois terços inferiores do epitélio associado a atipias citológicas.

4.1.2 Classificação segundo o Sistema Binário

- Alto Risco: presença de 4 alterações arquiteturais e 5 alterações citológicas.
- Baixo Risco: presença de menos de 4 alterações arquiteturais ou menos de 5 alterações citológicas.

A seguir os dados foram confrontados para o estabelecimento de um diagnóstico comum para ambos observadores. Os casos de carcinoma epidermóide de lábio não foram graduados histologicamente.

4.2 Reação de imunoistoquímica

Após a classificação das lesões, novos cortes foram confeccionados para realização de reações de imunoistoquímica pelo método estreptavidina-biotina. Para isto, foram preparadas lâminas silanizadas com cortes de 3 µm. Os cortes passaram

por processo de desparafinização em dois banhos de xilol e reidratação em cadeia descendente de álcoois, um banho em hidróxido de amônio 10% em solução de álcool 95°C foi realizado para remoção do pigmento formólico. As lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada com solução de ácido cítrico com pH 6.0, em banho-maria a 95°C, durante 30 minutos. Então, nova lavagem das lâminas em água destilada por 10 minutos. Foi realizado bloqueio da peroxidase endógena tecidual em solução na proporção 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e álcool metílico. Após lavagem em água destilada por mais 10 minutos, as lâminas receberam 3 banhos de 5 minutos com solução tampão TRIS pH7,4. Os dois anticorpos foram incubados manualmente em câmara úmida por 18 horas a 4°C. Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi usado o sistema o kit LSAB+ (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Sendo que o tempo de incubação do anticorpo de ligação foi de 30 minutos com lavagem em 3 banhos de 5 minutos em TRIS pH 7.4, e mais 30 minutos para incubação do complexo terciário, também seguido de lavagem com 3 banhos de 5 minutos de TRIS pH 7.4. As reações foram reveladas com diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468) e os cortes contracolorados com hematoxilina de Mayer. Em seguida os cortes foram submetidos à desidratação em cadeia em concentrações ascendentes de etanol, diafanização em xilol e então as lâminas foram montadas em resina permout.

4.3 Análise dos Resultados

A análise das reações foi feita qualitativamente, observando-se a distribuição da marcação em cada uma das camadas do epitélio das lesões. Quando presente, o epitélio adjacente, sem displasias, foi analisado separadamente.

Os resultados foram relacionados ao grau de displasia de cada caso ou à presença de malignidade, nos casos de carcinoma epidermóide.

5 RESULTADOS

5.1 Classificação das displasias epiteliais

As displasias epiteliais foram classificadas de acordo com critérios da OMS de duas maneiras: (a) como preconiza a OMS, em discreta, moderada ou intensa; (b) pelo sistema binário de graduação proposto por Kujan et al. (2006) em alto risco e baixo risco, levando em consideração a quantidade de alterações arquiteturais e citológicas presentes no tecido. As lesões foram classificadas por dois observadores separadamente e então comparadas, e quando não houve concordância, as lâminas de H&E foram analisadas em conjunto até que se chegasse a um consenso.

A lista de critérios analisados, assim como os resultados para as duas classificações utilizadas, podem ser vistos na Tabela 5.1. Foram selecionados 35 casos de queilite actínica, dentre eles, 11 foram classificados como displasia epitelial discreta (Figura 5.1A), 15 como displasia epitelial moderada (Figura 5.1B) e 9 como displasia epitelial intensa (Figura 5.1C). Todas as lesões classificadas como displasia epitelial discreta pelo método proposto pela OMS, foram classificadas como lesões de baixo risco pelo sistema binário de graduação. Da mesma maneira, lesões classificadas com displasias epiteliais intensas pelo primeiro método acima citado, foram classificadas como lesões de alto risco. Dentre as lesões consideradas displasias epiteliais moderadas, 60% foram consideradas de baixo risco e 40% alto risco, totalizando 20 lesões de baixo risco e 15 lesões de alto risco.

Os 12 casos de carcinoma epidermóide de lábio eram representados por fragmento de semimucosa labial exibindo no interior da lâmina própria neoplasia epiteliais em arranjo de cordões e ilhotas, por vezes em continuidade com o epitélio de revestimento. As células neoplásicas eram poliédricas grandes, com citoplasma abundante, núcleos grandes e claros de formato oval ou arredondado e exibindo nucléolos centrais. Individualmente, as células mostravam pleomorfismo em graus variados, aumento da proporção núcleo/citoplasma, hipercromatismo nuclear e evidenciação nucleolar. As mitoses estavam aumentadas e eram, com freqüência, atípicas. Eventualmente, observou-se a formação de pérolas córneas.

A lâmina própria era constituída por tecido conjuntivo denso apresentando quantidade variável de infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear. A degeneração basofílica do colágeno e das fibras elásticas pode ser evidenciada em todos os casos estudados, demonstrando a ação da radiação solar sobre esses tecidos (Figura 5.1D).

Tabela 5.1 - Classificação das displasias epiteliais– Classificação OMS; Sistema binário de graduação

Casos	Arquiteturais								Citológicos										Classificação OMS	Sist.binário gruação
	Estratif.Epit. Irregular	Perda da polaridade	Projeção em gota	Aumento nº de mitoses	Mitoses altas	Queratiniz. individual	Pérolas de queratina	Totais	Tamanho núcleo	Forma núcleo	Tamanho célula	Forma celular	Prop. citopl/núcleo	Aumento nuclear	Mitoses atípicas	Alter. dos nucléolos	Hipercromatismo	Totais		
1	+	+	+	-	-	-	-	3	+	+	+	+	-	-	-	-	+	5	D	B
2	-	+	-	-	-	-	-	1	+	+	-	-	-	-	-	+	-	3	D	B
3	+	+	+	-	-	-	-	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	5	D	B
4	+	+	-	-	-	-	-	2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	4	D	B
5	+	+	+	-	-	-	-	3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	4	D	B
6	-	-	+	-	-	+	-	2	-	+	-	-	-	-	-	+	+	3	D	B
7	-	+	-	-	-	-	-	1	-	+	-	-	-	-	-	+	+	3	D	B
8	+	-	-	-	-	-	-	1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	4	D	B
9	+	+	+	-	-	-	-	3	+	+	-	-	-	-	-	+	+	4	D	B
10	+	+	+	-	-	-	-	3	+	+	-	+	-	-	-	-	+	4	D	B
11	-	+	-	-	-	-	-	1	+	+	-	-	-	-	-	+	-	3	D	B
12	-	+	+	-	-	-	-	2	+	+	+	+	-	-	-	+	+	6	M	B
13	-	+	-	+	-	-	-	2	-	+	-	+	-	-	-	+	+	4	M	B
14	-	+	+	-	-	+	-	3	+	+	-	-	+	-	-	+	+	4	M	B
15	+	+	-	-	-	-	-	2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	5	M	B
16	-	+	+	-	-	-	-	2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	5	M	B
17	+	+	-	-	-	-	-	2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	5	M	B
18	+	+	-	-	-	-	-	2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	5	M	B
19	+	+	-	-	-	-	-	2	-	+	-	-	-	-	-	+	-	2	M	B
20	+	+	-	-	-	+	-	3	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8	M	B
21	+	+	-	+	-	+	-	4	+	+	+	+	-	-	-	+	+	6	M	A
22	+	+	+	-	-	+	+	5	+	+	+	+	-	-	-	+	+	6	M	A
23	+	+	+	-	-	+	-	4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	7	M	A
24	+	+	+	-	-	+	-	4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8	M	A
25	+	+	+	-	-	+	-	4	+	+	+	+	-	-	-	-	+	5	M	A
26	+	+	+	+	-	-	-	4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8	M	A
27	+	+	+	+	+	-	-	5	+	+	+	+	+	+	-	-	+	7	I	A
28	+	+	+	-	-	-	+	4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	7	I	A
29	+	+	+	+	-	-	-	4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8	I	A
30	+	+	+	+	-	-	-	4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8	I	A
31	+	+	+	+	-	-	-	4	+	+	-	-	+	+	-	-	+	5	I	A
32	+	+	+	-	-	+	+	5	+	+	-	+	+	+	-	+	+	7	I	A
33	+	+	+	+	-	+	-	5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8	I	A
34	+	+	+	+	-	-	-	4	+	+	+	+	+	+	-	-	+	7	I	A
35	+	+	+	+	-	+	-	5	+	+	+	+	+	+	-	+	-	7	I	A

Alteração presente (+); Alteração ausente(-), Discreta (D); Moderada (M); Intensa (I); Baixo Grau (B); Alto Grau(A);

Figura 5.1 - aspectos histopatológicos das lesões estudadas. A a C: queilite actínica. A - displasia epitelial discreta; B - displasia epitelial moderada; C - displasia epitelial intensa. D - carcinoma epidermóide de lábio. Hematoxilina e eosina (todas 200X no original)

5.2 Expressão imunoistoquímica da survivina

A análise dos resultados mostrou uma marcação irregular da survivina nas lesões de queilite actínica. Dos casos estudados, 40% apresentaram expressão da proteína. Entre as lesões de displasia epitelial discreta 3 (27%) dos casos tiveram marcação positiva, nos casos de displasia epitelial moderada, 7 (46%), e nas displasias epiteliais intensas 4 (44%) casos apresentaram expressão de survivina. De maneira geral, não houve um padrão de marcação, na maioria das vezes, presente em todo o epitélio, com localização celular citoplasmática (Figura 5.2 A e B). Apenas 4 (11%) casos apresentaram marcação de alguns núcleos, sendo 1 classificado como displasia epitelial discreta e 3 como displasia epitelial moderada (Tabela 5.2).

Quando analisadas pela classificação do sistema binário de graduação, observou-se que 35% dos casos de lesões com baixo risco tiveram marcação positiva, enquanto nas lesões de alto risco este índice foi de 46% (Tabela 5.2).

Nos carcinomas epidermóides de lábio, todas apresentaram expressão positiva, citoplasmática em todas as camadas do epitélio (Tabela 5.3). Em algumas ilhotas é possível notar-se menor intensidade de marcação na periferia (Figura 5.2C).

Tabela 5.2 - Expressão da proteína survivina em lesões de queilite actínica

<i>Survivina</i>				
	Casos	Localização Camadas do epitélio	Celular	Intensidade
Displasia discreta	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	2/3 inferior	C	++
	4	T	C	+
	5	-	-	-
	6	-	-	-
	7	-	-	-
	8	-	-	-
	9	-	-	-
	10	T	C/N	+
	11	-	-	-
Displasia moderada	12	T	C	++
	13	T	C/N	++
	14	-	-	-
	15	T	C	+
	16	-	-	-
	17	-	-	-
	18	2/3inferior	N	+
	19	-	-	-
	20	-	-	-
	21	T	C	+++
	22	-	N	+
	23	-	-	-
	24	-	-	-
	25	T	C	++
	26	T	C	++
Displasia intensa	27	T	C	+
	28	-	-	-
	29	-	-	-
	30	-	-	-
	31	-	-	-
	32	-	-	-
	33	T	C	++
	34	T	C	++
	35	T	C	+++

Marcação de todas as camadas do epitélio (T); marcação das camadas inferiores do epitélio. De acordo com a localização celular (C) citoplasma; (N) núcleo. Análise da intensidade: (+) fraca; (++) moderada; (+++) intensa. Marcação negativa (-).

Tabela 5.3 Expressão da survivina em carcinoma epidermóide de lábio

	<i>Survivina</i>		
	Localização		Intensidade
	Camada do epitélio	Celular	
36	T	C	+++
37	T	C	++
38	T	C	+++
39	T	C	+++
40	½ Inferior	C	++
42	T	C	++
43	T	C	++
44	T	C	++
45	T	C	+++
46	T	C	+++
47	T	C	+
48	Variável	C	++

Marcação de todo o epitélio (T); marcação citoplasmática (C). Análise da intensidade: (+) fraca; (++) moderada; (+++) intensa. Marcação negativa (-).

5.3 Expressão Imunoistoquímica da β -catenina

Todos os 35 casos de queilite actínica estudados apresentaram expressão da proteína β -catenina, que foi evidenciada pela presença da marcação na região de membrana citoplasmática (Figura 5.2D). A maioria dos casos de queilite actínica (85%) também apresentou marcação positiva para a proteína β -catenina no citoplasma, enquanto apenas 8 (22%) tiveram marcação nuclear (Tabela 5.4) (Figura 5.2E).

Quando presente, a marcação citoplasmática ocorreu nas camadas mais inferiores do epitélio e tipicamente, em células menos diferenciadas, com aspecto semelhante às da camada basal .

Entre as 11 lesões de displasia epitelial discreta 7 (63%) dos casos apresentaram citoplasmática e apenas 2 (18%) casos tiveram marcação nuclear. Já entre as 15 lesões de displasias epiteliais moderadas, 14 (93%) casos tiveram marcação citoplasmática além da expressão de membrana, mas apenas 1 (6%) teve marcação nuclear. Todas as 9 lesões de displasia epitelial intensa apresentaram marcação citoplasmática e 5 (55%) marcação nuclear.

Quando analisados pelo sistema binário de graduação, 15 (75%) das lesões de baixo risco tiveram marcação citoplasmática além da expressão de membrana e 3 (15%) apresentaram marcação nuclear. Já as lesões de alto risco tiveram marcação citoplasmática em todos os casos com expressão nuclear em 5 (33%) das lesões.

Dos 12 casos de carcinoma epidermóide de lábio estudados 10 (83%) foram positivos em membrana e citoplasma para a β -catenina. A expressão citoplasmática foi mais abundante nas porções mais baixas do epitélio e regiões de células indiferenciadas (Tabela 5.5). As ilhotas epiteliais apresentaram uma marcação citoplasmática mais intensa nas células periféricas, com perda desta expressão na sua porção central (Figura 5.2F).

O padrão de marcação apresentou variação nos diferentes graus de displasia epitelial, sendo que houve maior expressão citoplasmática nas regiões de células indiferenciadas e nas lesões de carcinoma epidermóide, a expressão mais significativa estava no tecido adjacente à neoplasia.

Tabela 5.4 - Expressão da proteína β -catenina em lesões de queilite actínica classificadas de acordo com o grau de displasia epitelial

<i>β-catenina</i>			<i>casos</i>	<i>Membrana</i>	<i>Citoplasma</i>	<i>Núcleo</i>
Displasia Discreta	Baixo Risco	1	+	+	Poucos	
		2	+	-	-	
		3	+	+	Poucos	
		4	+	½ inferior	-	
		5	+	½ inferior	-	
		6	+	-	-	
		7	+	1/3 inferior	-	
		8	+	-	-	
		9	+	1/3 inferior	-	
		10	+	½ inferior	-	
		11	+	-	-	
Displasia Moderada		12	+	+	Poucos	
		13	+	½ inferior	-	
		14	+	1/3 inferior	-	
		15	+	1/3 inferior	-	
		16	+	1/3 inferior	-	
		17	+	Poucos	-	
		18	+	½ inferior	-	
		19	+	-	-	
		20	+	1/3 inferior	-	
		21	+	1/3 inferior	-	
	Alto Risco	22	+	1/3inferior	-	
		23	+	½ inferior	-	
		24	+	+	-	
		25	+	1/3inferior	-	
		26	+	1/3 inferior	-	
		Displasia Intensa	27	+	+	Poucos
28	+		Poucos	Poucos		
29	+		+	Poucos		
30	+		1/3 inferior	-		
31	+		+	Poucos		
32	+		½ inferior	-		
33	+		½ inferior	-		
34	+		½ inferior	-		
35	+		+	Poucos		

Marcação positiva (+) em membrana em todos os casos. A expressão no citoplasma variou, podendo ser observada em alguns casos no 1/3 inferior do epitélio; ½ inferior do epitélio; restrito à camada basal; em regiões de células indiferenciadas; ou ainda poucos citoplasmas marcados distribuídos pelo epitélio. Marcação negativa (-).

Tabela 5.5 - Expressão da proteína β -catenina em carcinoma epidermóide de lábio

<i>β-catenina</i>	<i>Membrana</i>	<i>Citoplasma</i>	<i>Núcleo</i>
36	+	+	-
37	altas	baixas	-
38	altas	baixas	-
39	altas	baixas	-
40	-	-	-
41	altas	baixas	-
42	altas	baixas	-
43	altas	baixas	-
44	altas	baixas	-
45	-	-	-
46	periferia	indif	-
47	periferia	indif	-

Marcação positiva (+); Marcação negativa (-). Camadas altas do epitélio (altas); Camadas baixas do epitélio (baixa); Camadas periféricas das ilhotas epiteliais (superficial); Camadas Células indiferenciadas (indif).

Figura 5.2 - A a C: marcação imunoistoquímica para a proteína survivina. A - queilite actínica com displasia epitelial discreta; B - queilite actínica com displasia epitelial moderada exibindo parte das células negativas para o marcador; C - carcinoma epidermóide de lábio. D a F: marcação imunoistoquímica para a proteína B-catenina. D - queilite actínica exibindo displasia epitelial moderada mostrando apenas marcação da membrana citoplasmática; E - queilite actínica com displasia epitelial discreta exibindo marcação também da membrana e de alguns núcleos; F - carcinoma epidermóide de lábio no qual a marcação foi também de citoplasma principalmente nas regiões de frente de invasão (todas 200X no original)

6 DISCUSSÃO

A radiação UVB absorvida pela pele provoca, clinicamente eritema e bronzeamento por aumento da melanogênese; histologicamente leva a um adelgaçamento da camada córnea, epiderme e derme, além de edema intercelular e perivascular e infiltração perivascular. Seu efeito prolongado induz o surgimento de lesões no DNA, características do efeito agudo dos raios UV, que são os dímeros de pirimidina e os fotoprodutos 6-4. A exposição freqüente e a longo prazo leva a uma deterioração dos tecidos, com acúmulo de danos ao DNA e mutações gênicas (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004). A mutação do gene supressor de tumor p53, freqüentemente é encontrada, levando a uma diminuição da apoptose e aumento da proliferação celular, inicialmente provocando o aumento de células normais da pele e, na evolução, a carcinogênese e desenvolvimento do carcinoma epidermóide (LEFFELL, 2000) Estas características já podem ser detectadas em lesões cancerizáveis de pele (BRASANAC et al., 2005; LEFFELL, 2000; NISHIGORI, 2005).

Os lábios (particularmente o lábio inferior) encontram-se, como a pele, em situação anatômica que favorece a exposição à radiação ultravioleta solar. A lesão que se forma, resultante da exposição excessiva aos raios UV no lábio, é denominada queilite actínica e apresenta acantose ou atrofia do epitélio, adelgaçamento da camada de queratina, ulceração e diferentes graus de displasia epitelial. No tecido conjuntivo ocorre uma degeneração das fibras de colágeno característica à exposição à radiação ultravioleta, chamada de elastose solar,

acompanhada ou não de infiltrado inflamatório (MARTINEZ et al., 2005; SOARES; TORRES, 2006).

Neste trabalho, para avaliação das displasias epiteliais nas lesões de queilite actínica, foram usados dois métodos de classificação: o método proposto pela Organização Mundial de Saúde em 2005 e o Sistema Binário de graduação de displasias epiteliais, proposto por Kujan et al. (2006) para casos de lesões intra-orais.

A classificação das displasias de ocorrência no epitélio da mucosa oral sempre foi um desafio para os patologistas no sentido de indicar com precisão as lesões com maior ou menor potencial maligno. A subjetividade na classificação das lesões se dá pela falta de objetividade dos métodos de graduação das displasias epiteliais propostos. Estudos mostram que há pouca concordância entre observadores em decorrência da arbitrariedade na divisão das graduações, falta de calibração sobre os critérios e graduações e a falta de conhecimento da importância de cada critério no potencial maligno das lesões (KUJAN et al., 2007; REIBEL, 2003). Na tentativa de melhorar os métodos de graduação das displasias epiteliais da mucosa oral, o Grupo de Consenso em Displasia Epitelial Oral da OMS estabeleceu, em 2005, uma escala para graduação com 5 pontos: (1) hiperplasia; (2) displasia epitelial discreta; (3) displasia epitelial moderada; (4) displasia epitelial intensa; e (5) carcinoma *in situ*. Kujan et al. (2006) propuseram, a partir desta escala, um novo sistema binário de graduação de “baixo risco” e “alto risco”, baseado nos mesmos critérios arquiteturais e citológicos estabelecidos pela OMS. Em estudos para a validação deste método Kujan et al. (2006; 2007) mostraram que houve maior concordância entre o diagnóstico histopatológico e prognóstico das

lesões estudadas por eles, e também maior concordância entre observadores envolvidos no estudo.

No presente estudo, comparando os dois métodos de classificação utilizados, pode-se observar que as displasias epiteliais consideradas discretas por um método foram consideradas de baixo risco pelo outro, e a mesma concordância ocorreu em relação às displasias epiteliais intensas e de alto risco. Já as displasias epiteliais classificadas como moderadas pelo método preconizado pela OMS, foram divididas entre os dois grupos de alto e baixo risco.

O carcinoma epidermóide de lábio, na maioria das vezes se origina de lesões de queilite actínica já instaladas, com aspecto ulcerado, bordos elevados e endurecidos, característicos e de fácil diagnóstico clínico (HJORTDAL; NAEISS; BERNER, 1995). Geralmente possuem localização superficial e caráter pouco invasivo, favorecendo para seu prognóstico favorável e seu alto índice de cura (CASINO et al., 2006; HJORTDAL; NAEISS; BERNER, 1995; SALGARELLI et al., 2005; VUKADINOVI et al., 2007). A presença de metástases linfonodais é um importante fator prognóstico, chegando a diminuir 40% a taxa de cura quando há envolvimento cervical (GOORIS et al., 2001; VUKADINOVIC et al., 2007).

As lesões de lábio compartilham características comuns dos carcinomas de cavidade oral e dos carcinomas não-melanomas de pele. Seu prognóstico, no entanto, é mais favorável em comparação às neoplasias de boca, tendo comportamento mais agressivo que as neoplasias de pele (ABREU et al., 2006). O carcinoma epidermóide de lábio corresponde a 1% das neoplasias malignas humanas (HJORTDAL; NAEISS; BERNER, 1995) e é o câncer mais comum de cabeça e pescoço no mundo ocidental (KUBLER et al., 2001, ZITSCH et al., 1995),

quase desconhecido em algumas regiões da Ásia, onde são mais comuns os carcinomas intra-orais (KUBLER et al., 2001).

As alterações causadas pela radiação UV ativam mecanismos de prevenção da carcinogênese, entre eles o reparo de DNA e apoptose. Na falha desses mecanismos de reparo, ocorre a apoptose, que é um processo de controle genético importante na diferenciação celular e na eliminação de células senescentes, desnecessárias ou perigosas, que tenham algum dano ou estejam em proliferação celular descontrolada (ALTIERI, 2004; LO MUZIO et al., 2005). A inibição da apoptose pode levar à diminuição aberrante da morte celular, favorecer a proliferação de células mutadas e resultar em resistência a terapias anti-câncer (ALTIERI, 2004; LO MUZIO et al., 2005).

Vários passos do processo de diferenciação na queratinização são compatíveis com a apoptose. Existem duas vias fisiológicas de apoptose na pele, uma iniciada pela radiação UV através de um aumento de p53, que culmina na ativação da caspase 9, e a outra iniciada através da ligação do receptor de morte celular Fas, que ativa a caspase 8 (GROSSMAN et al., 2001).

A família das proteínas inibidoras de apoptose (IAP), importantes reguladoras de apoptose, possui em comum uma ou mais repetições chamadas IAP baculovírus (BIR), que são uma seqüência de cerca de 70 aminoácidos. Oito membros desta família já foram identificados, são eles, as proteínas: c-IAP1, c-IAP2, XIAP, NAIP, survivina, apollon, ML-IAP/livina e ILP-2. Entre elas, a survivina apresenta a expressão mais restrita em tecidos humanos adultos. Utilizando Northern blotting para detecção do mRNA da survivina, apenas expressão ocasional nos tecidos diferenciados é observada (AMBROSINI; ADIDA; ALTIERI, 1997; DEVERAUX;

REED, 1999). Entretanto, em células neoplásicas, a survivina é bem evidenciada (LI, 2003).

A survivina é a menor proteína da família das IAP e além de sua função na inibição da apoptose está relacionada com a mitose celular, no controle da fase G₂/M (ALTIERI, 2003b; GROSSMAN et al., 2001; LI, 2003). Foi associada com a organização central dos microtúbulos na interfase, e com pólos e espiras mitóticas na metáfase (ALTIERI, 2003a; Li, 2003; YAMAMOTO; TANIGAWA, 2001). É detectada em tecidos embrionários e fetais e está relacionado com o desenvolvimento e diferenciação celulares. Pode também ser encontrada em alguns tecidos adultos sadios como timo, medula óssea e epitélio basal do cólon (ALTIERI, 2003a). Foi detectada em altos níveis em neoplasias de pulmão, mama, cólon, estômago, esôfago, pâncreas, fígado, útero e ovário, linfomas não-Hodgkin's, leucemias, neuroblastoma, sarcomas de tecidos moles, carcinoma de pele melanoma e não melanoma e carcinomas de cavidade oral (ALTIERI, 2003a; JIANG et al., 2004; LO MUZIO et al., 2005; SATOH et al., 2001). Já foi também detectada em lesões cancerizáveis de pele (LEFFELL, 2000; NISHIGORI, 2006; SATOH et al., 2001). Sua expressão foi verificada em 80% dos carcinomas de boca (LO MUZIO et al., 2005).

A β -catenina é uma proteína bifuncional, identificada inicialmente por sua ligação com a caderina E nas junções aderentes com importante papel na adesão celular (MIGUEL; AMORIM, 2004). Sua repetição *armadillo* forma uma unidade compacta resistente à proteólise, que se liga às proteínas TCF, APC e caderina E. A porção amino- terminal da β -catenina é essencial para sua estabilização, pois possui uma série de resíduos de serina e treonina que uma vez fosforilados levam a sua degradação (WILLERT; NUSSE, 1998).

A regulação do ciclo celular pela Wnt tem um papel não só na carcinogênese, mas também na regeneração de tecidos normais e proliferação de células germinais (BEHRENS; LUSTIG, 2004). A localização nuclear da β -catenina é um marcador de ativação aberrante da via Wnt, podendo ocorrer em consequência a mutações na β -catenina, APC, Axina ou mesmo por uma super- expressão de fatores de sinalização da via Wnt (PIZEM et al., 2005).

Neste trabalho foi estudada a expressão das proteínas survivina e β -catenina em lesões de queilite actínica e carcinomas epidermóides de lábio e as marcações foram relacionadas ao grau de displasia epitelial presente nas lesões de queilite actínica.

A relação da expressão da survivina com os diferentes graus de displasia epitelial mostrou uma ausência de padrão. A marcação foi similar, independente das alterações presente no epitélio. A survivina é considerada um marcador de prognóstico e evolução da doença. Normalmente não é encontrada em tecidos diferenciados sadios e sua expressão em lesões com potencial maligno, como é o caso da queilite actínica, foco deste estudo, pode ser considerada como fator preocupante, e poderia indicar acompanhamento mais próximo dos pacientes. Porém a presença de marcação em lesões classificadas como tendo displasia epitelial discreta levanta dúvidas sobre a real natureza desta lesão e o significado desta marcação. Mais estudos são necessários para que se possa utilizar a survivina como marcador de prognóstico neste tipo de lesão. Por outro lado, sabe-se que a classificação das displasias epiteliais segue critérios subjetivos de diferentes classificações e dos próprios observadores, logo seus diagnósticos podem não ser definitivos.

A expressão positiva da survivina nas lesões de carcinoma epidermóide de lábio foi compatível com dados da literatura. A localização celular predominante foi o citoplasma. Estudos relatam que a expressão da survivina pode ocorrer em núcleo,

mas sem explicações suficientes para esta localização. A marcação de células em mitose pode ser dependente da participação desta proteína no ciclo celular (PIZEM et al., 2005).

A análise das reações imunoistoquímicas para β -catenina mostrou que a expressão em membrana citoplasmática foi preservada em todos os casos estudados, tanto de queilite actínica quanto de carcinoma epidermóide. A ocorrência de marcação citoplasmática e nuclear em parte das lesões mostrou uma alteração no sistema de degradação da β -catenina citoplasmática que pode ter sido desencadeada por mutações, tanto nas proteínas do complexo de destruição como a axina, APC e GSK3, como também em algum outro fator da via Wnt, ou ainda, alterações na via do AKT, que levam à fosforilação do GSK3, tornando-o inativo, contribuindo também para o acúmulo citoplasmático da β -catenina. Uma vez acumulada no citoplasma, a β -catenina pode ser translocada para o núcleo, onde faz a transcrição de genes alvos. O aumento de sua marcação citoplasmática e nuclear foi compatível com o aumento do grau de displasia do epitélio, ou seja, lesões com número mais elevado de alterações e as lesões de carcinoma epidermóide tiveram este tipo de marcação. Este resultado pode significar um aumento da proliferação celular, perda da adesão com maior potencial de invasão e metástase e, considerando a survivina como possível gene alvo da β -catenina, pode-se sugerir uma diminuição na apoptose. Dos 8 casos de queilite actínica que apresentaram marcação nuclear da β -catenina, 4 apresentaram marcação positiva da survivina, não permitindo fazer uma correlação entre as duas proteínas. Em nenhum dos casos estudados houve marcação nuclear para duas proteínas concomitantemente. Dezenas de genes já foram identificados como alvo da via Wnt/ β -catenina, porém

ainda se desconhece qual mecanismo de especificidade promove a transcrição dos diferentes genes (GORDON; NUSSE, 2006).

Dentre as lesões de carcinoma epidermóide de lábio, nenhuma apresentou marcação nuclear para a β -catenina. A marcação citoplasmática foi predominante na porção inferior do epitélio, em região de frente de invasão.

Por existirem uma série de fatores já citados, relacionados com a via Wnt e proteínas ligadas à ativação e degradação da β -catenina que podem estar alterados na carcinogênese, ela não pode ser considerada como fator prognóstico confiável, mas sabe-se que sua mutação leva a um maior potencial de invasão e metástase dos carcinomas. A expressão da β -catenina mostra alterações nos mecanismo de proliferação e diferenciação celular, mas é necessário o estudo de outras proteínas a ela relacionadas para a identificação das possíveis mutações que levaram ao seu acúmulo no citoplasma.

A survivina foi recentemente descoberta na família das IAPs, e sua expressão na grande maioria dos carcinomas humanos chamou a atenção para uma possível participação precoce na carcinogênese. A ausência de expressão em tecidos saudáveis, faz dela um alvo para terapias anti-câncer mais específicas com menos efeitos colaterais (FULDA; DEBATIN, 2006). Na maioria das neoplasias malignas estudadas, a survivina foi relacionada com pior progressão da doença, diminuição no tempo de sobrevida e maior agressividade. Para os carcinomas de cavidade oral a afirmação acima parece se verdadeira. Estudos com avaliação de prognóstico são necessários para avaliar o significado da expressão da survivina em lesões de lábio.

A expressão destas duas proteínas nas lesões de lábio evidencia as alterações causadas pela radiação UV. A radiação UV provoca mutações na p53, que em seu estado normal é responsável pela repressão da transcrição do gen da

survivina (NYLANDER; DABELSTEEN; HALL, 2000). Então as mutações da p53 permitem que ocorra transcrição do gene da survivina.

Ao correlacionar as classificações de displasia epitelial utilizadas, com as marcações imunoistoquímicas, pode-se notar que a marcação da survivina teve maior positividade entre as lesões de alto risco, e da mesma maneira, em relação à β -catenina, houve maior marcação citoplasmática e nuclear nestas lesões. Apesar de não se ter o prognóstico das lesões, as características nas expressões das duas proteínas no grupo de lesões de alto risco pode ser um bom indicador sobre a confiabilidade do sistema binário de graduação, e sua relação com as alterações genéticas das lesões.

As lesões em lábio encontram-se em uma região de transição com características distintas, com poucos estudos a seu respeito. Apesar do câncer de lábio ser o mais freqüente entre os cânceres de boca, seu baixo índice de mortalidade não desperta grandes preocupações em estudos. Autores acreditam na queilite actínica como uma fase inicial do carcinoma de lábio. Descobrir marcadores prognósticos que possam auxiliar na avaliação das alterações das displasias epiteliais presentes nestas lesões pode ajuda a prevenir este tipo de câncer, evitar cirurgias mutiladoras com perda de função e estéticas para os pacientes, é essencial para diminuição da morbidade.

7. CONCLUSÕES

Através do presente estudo, pode-se concluir:

7.1 A ocorrência de marcação citoplasmática e nuclear da β -catenina na lesões estudadas apontam para alterações na sua via de sinalização.

7.2 A expressão da survivina em lesões de queilite actínica mostra o potencial maligno destas lesões, e sua participação no processo de carcinogênese.

7.3 A expressão positiva da survivina em 100% dos casos de carcinoma epidermóide de lábio é compatível com a literatura, e é necessária uma relação com a evolução da doença para avaliação do prognóstico.

7.4 Os métodos de graduação de displasias epiteliais são subjetivos e podem não corresponder às alterações genéticas dos tecidos.

7.5 O sistema binário de graduação de displasias epiteliais pode ser eficiente e possui maior concordância entre os observadores.

REFERÊNCIAS¹

Abreu MA, Silva OM, Neto Pimentel DR, Hirata CH, Weckx LL, Alchorne MM, et al. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2006;72(6):767-71.

Altieri DC. Molecular circuits of apoptosis regulation and cell division control: the survivin paradigm. *J Cell Biochem* 2004;92(4):656-63.

Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer. *Prog Cell Cycle Res* 2003a;5:447-52.

Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Rev Cancer* 2003b;3(1):46-54.

Altznauer F, Martinelli S, Yousefi S, Thürig C, Schmid I, Conway EM et al. Inflammation-associated cell cycle-independent block of apoptosis by Survivin in Terminally Differentiated Neutrophils. *J Exp Med* 2004;199(10):1343-54.

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

Barker N, Clevers H. Catenins, Wnt signaling and cancer. *Bioessays* 2000;22(11):961-5.

Barnes L, Evenson JW, Reichart P, Sindransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC Press: Lyon; 2005.

Behrens J, Lustig B. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol*. 2004;48(5-6):477-87.

Brasanac D, Boricic I, Todorovic V, Tomanovic N, Radojevic S. Cyclin A and β -catenin expression in actinic keratosis, Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol* 2005;153(6):1166-75.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Casino AR, Toledano IP, Jorge JF, Diez JMO, Llobet CC, Prat MA. Brachytherapy in lip cancer. *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal* 2006;11:E223-9.

de Aguiar FCA, Kowalski LP, de Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. Disponível em URL: <http://www.j.oraloncology/doi:10.1016> [2007 Mar.07].

de Visscher JG, van der Waal I. Etiology of cancer of the lip. A review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998;27(3):199-203.

Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes & Development* 1999;13:239–52.

El-Bahrawy M, El-Masry N, Alison M, Poulsom R, Fallowfield M. Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003;148(5):964-70.

Fulda S, Debatin KM. Targeting Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) for diagnosis and treatment of human diseases. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* 2006;1(1):81-9.

Gooris PJ, Schaapveld M, Vermey A, Otter R, Rispens A, Roodenburg JL. Regional guideline for diagnosis and treatment of squamous cell carcinoma of the lip: what is the level of compliance? *Int J Qual Health Care* 2001;13(2):143-50.

Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 2006;281(32):22429-33.

Grossman D, Kim PJ, Blanc-Brude OP, Brash DE, Tognin S, Marchisio PC, et al. Transgenic expression of surviving in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J Clin Invest* 2001;108(7):991-9.

Hjortdal O, Naess A, Berner A. Squamous cell carcinomas of the lower lip. *J Craniomaxillofac Surg* 1995;23(1):34-7.

Horta MC, de Assis LA, de Souza AF, de Araujo VC, Gomez RS, Aguiar MC. p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007;36(2):88-92.

Huang M, Wang Y, Sun D, Zhu H, Yin Y, Zhang W, et al. Identification of genes regulated by Wnt/ beta-catenin pathway and involved in apoptosis via microarray analysis. *BMC Cancer* 2006;6:221-31.

James Nelson W, Nusse R. Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303:1483-7.

Jiang Y, Saavedra HI, Holloway MP, Leone G, Altura RA. Aberrant regulation of survivin by the RB/E2F family of proteins *J Biol Chem* 2004;279(39):40511-20.

Karim R, Tse G, Putti T, Scolyer R, Lee S. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathol* 2004;36:120-8.

Kaugars GE, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burnd JC, Abbey LM. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88(2):181-6.

Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet* 2003;362(9379):205-9.

Kubler AC, de Carpentier J, Hopper C, Leonard AG, Putnam G. Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001;30(6):504-9.

Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol* 2007;43(3):224-31.

Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol*. 2006;42(10):987-93.

Leffell DJ. The scientific basis of skin cancer *J Am Acad Dermatol* 2000;42(1Pt 2):18-22.

Li F. Survivin study: what is the next wave? *J Cell Physiol* 2003;197(1):8-29.

Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Pezzetti F, Stabellini G, Laino G, et al. Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Letters* 2005; 225(1): 27-33.

Lyakhovitsky A, Barzilai A, Fogel M, Trau H, Huszar M. Expression of E- Cadherin and Beta- catenin in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursors. *Am J Dermatopathol* 2004;26(5):372-8.

Main JHP, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *Can Dent Assoc J* 1994;60(2):113-6.

Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathological characteristics in 65 cases. *Oral Diseases* 2004;10:212-6.

Martínez A, Brethauer U, Rojas IG, Spencer M, Mucientes F, Borlando J, et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med* 2005;34(5):257-62.

Matsumura Y, Ananthaswamy HN. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol Applied Pharmacol* 2004;195:298-308.

Miguel MCC, Amorim RFB. Multifuncionalidade da beta-catenina e suas implicações na patologia. *Rev Bras Pato Oral* 2004;3:57-61.

Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002;296(5573):1644-6.

Nishigori C. Cellular aspects of carcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* 2006;5:208-14.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan; 2004.

Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2000;29:413-25.

Parise Jr O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Ed Sarvier; 2000.

Pfeifer GP, You YH, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutation Res* 2005;571:19-31.

Pinto Jr DS. Expressão e participação da beta catenina em carcinomas epidermóides bucais. Análise tecidual e em cultivo celular [Tese de Livre- Docência]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

Pizem J, Cört A, Zdravec-Zaletel L, Popovic M. Survivin is a negative prognostic factor marker em medulloblastoma. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2005;31(4):422-8.

Regezi JA, Sciubba JJ. Patologia bucal: correlações clinicopatológicas. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan; 1991.

Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14(1):47-62.

Rojas IG, Spencer ML, Martínez A, Maurelia MA, Rudolph MI. Characterization of mast cell subpopulation in lip cancer. *J Oral Pathol Med* 2005;34:268-73.

Rojas IJ, Martínez A, Pineda A, Spencer ML, Jimenez M, Rudolph MI. Increased mast cell density and protease content in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med* 2004;3:567-73.

Salgarelli AC, Sartorelli F, Cangiano A, Collini M. Treatment of lower lip cancer: an experience of 48 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005;34(1):27-32.

Santos JN, Souza SOM, Nunes FD, Sotto MN, Araujo VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol* 2003;30(4):237-41.

Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer* 2001;92(2):271-8.

Shieh YS, Chang LC, Chiu KC, Wu CW, Lee HS. Cadherin and catenin expression in mucoepidermoid carcinoma: correlation with histopathologic grade, clinical stage, and patient outcome. *J Oral Pathol Med* 2003;32:297-304.

Tapia JC, Torres VA, Rodriguez DA, Leyton L, Quest AFG. Casein kinase 2 (CK2) increases survivin expression via enhanced beta-catenin-T cell factor/ lymphoid enhancer binding factor-dependent transcription. *PNAS* 2006;103(41):15079-84.

Vukadinovic M, Jezdic Z, Petrovic M, Medenica LM, Lens M. Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: analysis of a 10-year experience in 223 patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(4):675-9.

Yamaguchi Y, Takahashi K, Zmudzka BZ, Kornhauser A, Miller SA, Tadokoro T, et al. Human skin responses to UV radiation: pigment in the upper epidermis protects against DNA damage in the lower epidermis and facilitates apoptosis. *FASEB J* 2006;20:E630-9.

Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc* 2001;34(4):207-12.

WHO Health effects of UV radiation. Disponível em: URL: <http://www.who.int/entity/uv/health/en/> [2007 Jan20].

Willert K, Nusse R. β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev* 1998;8:95-102.

Wilson R, Goyal L, Ditzel M, Zachariou A, Baker DA, Agapite J, et al. The DIAP1 RING finger mediates ubiquitination of Dronc and is indispensable for regulating apoptosis. *Nat Cell Biol* 2002;4(6):445-50.

Zhu N, Gu L, Findley HW, Chen C, Dong JT, Yang L, et al. KLF5 Interacts with p53 in Regulating Survivin Expression in Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Biol Chem* 2006;281(21):14711-8.

Zitsch RP 3rd, Park CW, Renner GJ, Rea JL. Outcome analysis for lip carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;113(5):589-96.

Anexo – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO Protocolo 199/06

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"Avaliação da expressão imunoistoquímica das proteínas survivina e β -Catenina em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio"**, de responsabilidade da Pesquisadora **Juliana Lucena Schussel**, sob orientação da Professora Doutora **Marília Trierveiler Martins**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 05 de dezembro de 2006

Prof. Dr. **Rogério Nogueira de Oliveira**
Coordenador do CEP-FOUSP