

ESTUDO DA IMUNOLocalIZAÇÃO DE MIOSINA V EM TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES E EPIDERMÓIDES BUCAIS

ANNA FLÁVIA SANTOS¹, LORENNIA MARQUES DIAS ALVES¹, FOUED SALMEN ESPINDOLA¹

RESUMO

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento desordenado de células, resultante do acúmulo de alterações genéticas ou epigenéticas somáticas de um tecido previamente sadio. Evidências diretas relacionam as miosinas-V (MV) com a função de apoptose, que é de vital importância para a sobrevivência e o equilíbrio de qualquer organismo vivo. Por isso, foi verificado a imunolocalização de miosina V em tumores epidermóides bucais e de glândulas salivares. Observou-se nos ensaios de imunohistoquímica e de Western blot que a miosina V não está super expressa nos tumores epidermóides bucais e uma proteína de 58 Kda apareceu em níveis de expressão elevada no gel de eletroforese. Estes resultados indicaram que a miosina V não está relacionada com a progressão do tumor epidermóide bucal ou que novos ensaios e Kits mais sensíveis devem ser utilizados para validar os resultados obtidos.

Palavras-chaves: imunolocalização, miosina V, glândulas salivares, epidermóides bucais.

ABSTRACT

The cancer is an illness characterized for the disordered growth of cells, resultant of the accumulation of somatic genetic or epigenetics alterations of one tissue previously healthy. Direct evidences relate myosin V (MV) with the function of apoptosis, that it is of vital importance for the survival and the balance of any alive organism. Therefore, it was verified the immunolocalization of myosin V in oral epidermoids and salivary glands glands . It was observed in the immunohistochemistry assays and in Western blot that myosin V is not over express in the oral epidermoids tumors and a protein of 58 Kda appeared at high levels of expression in the gel of electrophoresis. These results indicated that myosin V is not related with the progression of the oral epidermoids tumors or that new assays and more sensible Kits must be used to validate the results gotten.

Key words: immunolocalization, myosin V, salivary glands, oral epidermoids.

Introdução:

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (2000), o câncer é a segunda doença que mais leva a óbitos no Brasil, sendo uma doença caracterizada pelo crescimento desordenado de células, resultante do acúmulo de alterações genéticas ou epigenéticas somáticas de um tecido previamente sadio. As células alteradas passam a se comportar de forma anormal, multiplicam - se de maneira descontrolada, mais rapidamente do que o tecido à sua volta, invadindo-o, esse processo passa por várias etapas antes de chegar ao tumor maligno propriamente dito (SMELTZER;BARE, 1998).

Os tumores de cabeça e pescoço compreendem a cavidade oral, seios paranasais, complexos orofaríngeos, glândulas salivares e glândula tireóide, sendo que o sítio mais freqüentemente atingido é a cavidade oral, correspondendo a cerca de 30% dos cânceres de cabeça e pescoço (COTRAN, et al, 2000).

Segundo dados no Instituto Nacional do Câncer (2004), os números de novos casos de cânceres da cavidade oral veem aumentando nos últimos anos, com o Brasil ocupando o sétimo lugar mundial.

O câncer de boca é uma denominação que inclui os cânceres de lábio e de cavidade oral (mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua bucal e

assoalho da boca). O câncer de lábio é mais frequente em pessoas brancas, e registra maior ocorrência no lábio inferior em relação ao superior. O câncer em outras regiões da boca acomete principalmente tabagistas e os riscos aumentam quando o tabagista é também alcoólatra (INCA, 2008).

O câncer bucal é o sexto câncer com maior prevalência em todo o mundo, sendo constatado diferenças na prevalência segundo diferentes autores e regiões pesquisadas (JACOBS, 1987). De acordo com La Vecchia (1997), uma tendência no aumento da mortalidade causada pelo câncer bucal tem sido observada no mundo atualmente e mais casos de câncer bucal têm sido diagnosticados.

A incidência de neoplasias malignas da cavidade bucal obedece a uma distribuição por sexo que é principalmente ligada à exposição a agentes carcinogênicos ou a componentes de natureza genética pouco conhecida. Isso pode fazer com que um carcinoma tenha uma evolução variável em decorrência da intervenção de um fator ligado a hábitos peculiares a pessoas de determinado sexo (RAPOPORT, 1997). Por exemplo: o consumo de tabaco, sob a forma de cigarro, tem crescido rapidamente entre a população do sexo feminino, mas o hábito

de fumar cachimbo ou charuto ainda apresenta ampla predominância entre os homens. Da mesma forma, o consumo de fumo mascado não tem aumentado entre as mulheres na mesma proporção que o hábito de fumar (RAPOPORT, 1997). Esses dados corroboram com a incidência mais alta de carcinomas bucais em indivíduos do sexo masculino.

Hamada et al. afirmaram que o álcool e o tabaco seriam responsáveis por níveis de incidência de câncer bucal no Brasil comparáveis aos da Índia, país em que o risco mais elevado tem sido apontado como associado ao hábito de mascar tabaco.

As estatísticas mostram que 95% dos nódulos palpáveis da glândula parótida são de origem tumoral, sendo esta glândula a mais frequentemente acometida. O palato é o sítio mais comum dos tumores de glândulas salivares menores. Aproximadamente 25% dos tumores da parótida, 50% dos tumores da submandibular, 81% dos tumores das salivares menores são malignos (INCA,2002).

Ainda, segundo o INCA (2002) o tumor maligno mais comum da glândula parótida é o carcinoma mucoepidermóide. O carcinoma adenóide cístico é o tumor maligno mais frequente da glândula submandibular e das glândulas salivares menores.

Os tumores malignos das glândulas salivares, de baixo grau de malignidade e em estádios iniciais, são usualmente curáveis por ressecção adequada como único tratamento. Este prognóstico também é influenciado pela localização da lesão: melhor na parótida que na glândula submandibular e menos favorável na glândula sublingual ou nas glândulas salivares menores (INCA, 2002).

O equilíbrio entre a proliferação e a morte celular (apoptose) é de vital importância para a sobrevivência de qualquer organismo vivo (WATTRE, 1999). A apoptose é um processo biológico de morte celular, por meio do qual os organismos multicelulares eliminam suas células danificadas ou que já cumpriram seu papel. Possui, portanto, um papel essencial no início do desenvolvimento e na homeostase tecidual. Quando sua regulação é alterada podem ocorrer doenças autoimunes, degenerativas ou o câncer (STRASSER *et al.* 2000; REED, 2003).

As células cancerosas demonstram relações alteradas na via de apoptose, o que desvia o equilíbrio em prol da sobrevivência de células que deveriam ser deletadas do tecido (LETAI *et al.*, 2002; MOORE *et.al.* 2007).

Evidências diretas relacionam as miosinas-V (MV) com a função de apoptose. Segundo Puthalakath e

colaboradores (2001), a miosina V interage via cadeia leve de dineína DLC com a Bmf, um membro pró-apoptótico, sequestrando-a no citoesqueleto de actina e prevenindo sua interação com membros anti-apoptóticos. A perda da adesão celular leva à dissociação dos parceiros DLC e MV, liberando Bmf (BH3-only) e possibilitando assim, sua interação com os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 (CORY; ADAMS, 2002).

A homeostase tecidual é regulada pela apoptose, que é regulada pelas caspases. A família Bcl 2 é o centro regulador das atividades das caspases e a oposição da ação dos membros pró e anti-apoptóticos decide a sobrevivência ou a morte celular. A apoptose é sempre um fenômeno ímpar no câncer e que pode limitar e terapia convencional.

Os tratamentos inespecíficos, tais como a radioterapia e a quimioterapia, que se aplicam ainda à maioria dos tipos de câncer, não condizem com o conhecimento acumulado sobre os processos moleculares que envolvem a formação dos tumores, portanto, há grande expectativa de que investimentos direcionados à pesquisa nessa área venham a revolucionar o tratamento do câncer no decorrer dos próximos anos.

O presente trabalho teve como objetivo o estudo de uma ferramenta molecular que poderá ser utilizada na busca por novos agentes terapêuticos, capazes de extinguir tumores, reduzi-los ou ao menos sensibilizá-los a outras drogas ou terapias. Através da imunohistoquímica e Western blot, MV será testada como marcador prognóstico e diagnóstico do câncer. Para tal análise, será utilizado anticorpo policlonal para MV produzido e purificado a partir de soro de coelhos imunizados com proteína de fusão.

A análise foi direcionada aos tumores de glândulas salivares e epidermóides bucais coletados nos últimos seis anos e no ano atual, no Hospital Odontológico e Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Materiais e Métodos

Seleção e Coleta do Material Biológico:

Para a extração das proteínas, foram coletados tumores epidermóides bucais e de glândulas salivares, de pacientes submetidos à retirada cirúrgica deste material no Hospital das Clínicas da UFU no período de setembro de 2007 a julho de 2008, que estiveram de acordo com termo de consentimento proposto pelo

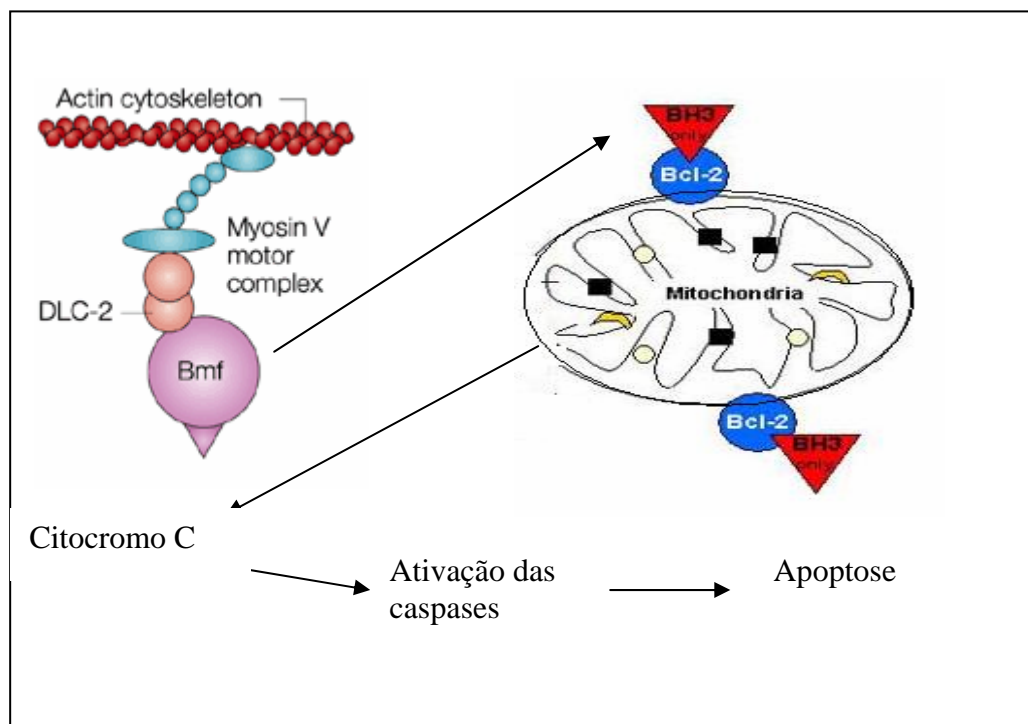


Figura 1: Via de sinalização da apoptose. Interação da Miosina V, DLC2, Bmf (Bh3 only), Bcl2 provoca a liberação do citocromo C do interior da mitocôndria , que ativa as caspases desencadeando a apoptose.

projeto e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFU. As amostras de tecidos foram coletadas imediatamente após a cirurgia, embrulhadas em folha de alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C .

Para o procedimento de imunohistoquímica, os 23 tumores (18 epidermóides e 5 glandulares) foram obtidos no Setor de Patologia do Hospital das Clínicas da UFU.

Imunohistoquímica:

Foram utilizados 4 lâminas de tumores epidermóides bucais para os ensaios de imunohistoquímica, obtidas no Setor de Patologia do Hospital das Clínicas da UFU.

Estas foram hidratadas seguindo o procedimento de dois banhos consecutivos de xilol de 5 minutos cada, um banho de álcool 50 % e xilol 50 % de 5 minutos, dois banhos consecutivos de álcool 100% de 1 minuto cada, álcool 95 % de 1 minuto, álcool de 90% de 1 minuto, álcool 85 % de 1 minuto, álcool 70 % de 1 minuto, álcool 50 % de 1 minuto, dois banhos

consecutivos de água destilada de 30 segundos cada e um banho de deionizada de 30 segundos.

Os tecidos sofreram recuperação antigênica. As lâminas foram mergulhadas em um coplin contendo tampão Citrato (4mM) pH 6,0 acrescido de 0,05% de Tween 20 pré aquecido a 96°C por 30 minutos em *banho-maria*.

Depois, as lâminas passaram por um resfriamento natural por 30 minutos, em seguida foram lavadas em PBS por 15 minutos (3x5 minutos). Foi realizado um bloqueio com peroxidase (20 ml de H₂O₂ vol 30 + 180 mL de água destilada) por 30 minutos à temperatura ambiente, em câmara escura.

As lâminas foram lavadas em água destilada e em seguida foram lavadas com PBS por 15 minutos (3x5 min). Depois, foi feito um bloqueio de proteínas com uma solução para bloqueio de proteínas da DAKO por 20 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água destilada e, em seguida, lavadas com PBS por 15 minutos (3x5 min).

As lâminas passaram, então, pela incubação com o anticorpo primário -MV (cauda medial), que ocorreu à temperatura ambiente por 1 hora (O anticorpo diluído foi colocado sobre o tecido). As lâminas foram lavadas em água destilada e, em seguida, lavadas com PBS (ou TBS-Tween) por 15 minutos (3x5 min). Em

seguida, ocorreu uma incubação em Link – DAKO por 30 minutos à temperatura ambiente (O Link foi colocado – 200 uL - sobre o tecido). As lâminas foram lavadas em água destilada e em seguida foram lavadas com PBS por 15 minutos (3x5 min). Posteriormente, ocorreu uma incubação em solução DAKO Streptoavidina - POD por 30 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em água destilada e em seguida foram lavadas com PBS por 15 minutos (3x5 min).

Finalmente, foi feita a revelação com sistema DAB – DAKO por aproximadamente 5 minutos, as lâminas foram mergulhadas em água para a parada da reação. As lâminas passaram pelo processo de desidratação, que consiste em banhos de 1 minuto em álcool 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100% seguidos de um banho de 5 minutos em uma solução álcool:xilol (1:1) e 2 banhos de 5 minutos em xilol. Após a desidratação as lâminas, foram montadas com utilização de Eantelan para a colagem das lamínulas. Os cortes foram analisados em microscópio óptico para a imunolocalização das proteínas de interesse.

Homogeneização dos tecidos e Dosagem Protéica:

Os tumores epidermódies bucais foram coletados cirurgicamente, imersos

em nitrogênio líquido para serem conservados e macerados e em seguida, foram homogeneizados utilizando - se homogeneizador com microsonda em tampão Hepes contendo ATP, quelantes e inibidores. As amostras foram centrifugadas (13.200 rpm a 4°C por 10 minutos), os sobrenadantes foram reservados e os sedimentos ressuspensos no mesmo tampão.

Foram retiradas alíquotas de cada amostra para dosagem de proteína total utilizando- se como padrão a concentração protéica de BSA – Soro Albumina Bovina, seguindo BRADFORD (1976); as determinações de concentração protéica foram feitas em duplicatas e a absorbância medida a 595nm. Ao volume restante foi acrescentado o tampão da amostra 10 vezes concentrado. A seguir, as amostras foram fervidas e estocadas.

Eletoforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

As amostras estocadas foram aplicadas em gel gradiente acrilamida: bis-acrilamida (5-22%) e empilhamento 3% acrilamida. Os géis de separação foram preparados com glicerol 0.7%, tampão 360 mM de separação pH 8.8 (Tris-base 45.38%, 6N HCl 10%), SDS 10%, acrilamida/bisacrilamida (30:0.8) nas devidas concentrações, TEMED 0.003% e PSA 0.0128%. O gel de empilhamento foi

preparado com tampão de empilhamento 124 mM pH 6.8 (Tris-base 15.32% e HCl 12N 10%), SDS 0.12%, acrilamida/bisacrilamida (30:1.6) a 3%, TEMED 0.006 e PSA 0.150% (LAEMILI, FAVRE; 1973).

A eletroforese foi realizada com tampão eletrodo (100mM Tris, 7.8mM EDTA, 770mM glicina, SDS 3% pH 8.3) e corrente constante de 30mA. Após a corrida, o gel foi corado em solução corante (Croomasie Brillant Blue R 0.125%, metanol 50% e ácido acético 9%) por 1 hora e descorado em solução descorante (metanol 5% e ácido acético 9%). Os géis foram armazenados em água destilada, escaneados e, assim, realizado a análise dos resultados do padrão de expressão das proteínas da amostra de tumor epidermóide bucal.

Transferência eletroforética do gel para a membrana de nitrocelulose- “WESTERN BLOT” (TOWBIN ET AL., 1979)

As amostras separadas por SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana (0,45 µm), submetida a uma corrente constante de 200 mili-A para transferência durante 2 horas, utilizando-se tampão eletroblot (10 mM NaHCO₃, 3 mM NaCO₃, 0,01% SDS, 20% metanol e água mili- Q). Após a transferência, a membrana foi corada com ponceu, para verificar se a

transferência das proteínas, do gel para membrana, havia ocorrido.

Havendo transferência, a membrana foi lavada 3 vezes de 15 minutos em TBS-T e bloqueada em TBS-T acrescido de 5% de leite mólico, overnight. Após a incubação a membrana foi lavada 3 vezes de 15 minutos na solução de TBS-T. Foi aplicado, então o anticorpo primário MV-cauda medial na diluição de 1:200 em PBS por 4 hora à 4 °C. A seguir a membrana passou por uma nova lavagem por 1 vez de 15 minutos em TBS-T e 1 vez de 15 minutos com tampão AP e foi incubada em anticorpo secundário anti-coelho IgG conjugado com tampão AP na diluição de 1:100 em PBS-T por 3 horas à 4° C. A revelação foi realizada por NBT/ AP, por aproximadamente 30 minutos, até a visualização das bandas protéicas de interesse.

Resultados e Discussões:

Seleção e Coleta do Material Biológico:

A coleta dos tumores frescos foi realizada de acordo com a marcação das cirurgias no Hospital das Clínicas da UFU. Além disso, foi realizado o acompanhamento do ambulatório do Hospital das Clínicas da UFU e do Hospital do Câncer, para saber o dia da realização das cirurgias e obter a assinatura dos pacientes no termo de consentimento

para participar da pesquisa. Foram coletados 18 tumores epidermóides bucais e 5 de glândulas salivares.

Imunohistoquímica:

Os resultados obtidos através dos ensaios de imunohistoquímica revelaram, conforme ilustrado na figura 2, uma marcação inespecífica de miosina V em células epidermóides bucais e uma marcação em células endoteliais dos vasos sanguíneos, o que indica que essa proteína pode não estar relacionada com a progressão desse tipo de tumor ou a concentração do anticorpo e a técnica utilizada não foi satisfatória. Novos ensaios devem ser realizados para se estabelecer a concentração exata de anticorpo a ser utilizado, padronizar a técnica e obter melhores imagens.

Homogeneização dos tecidos e Dosagem Protéica:

A técnica de homogeneização utilizada foi eficiente para a extração das proteínas dos tumores epidermóides bucais. A dosagem protéica demonstrou uma concentração de 1,19µg de proteínas por µl da amostra. Isso foi importante para estabelecer quanto de amostra seria aplicado no gel de poliacrilamida. Assim, foi aplicado 2 µl, 3 µl, 4 µl e 5 µl da

amostra para determinar em qual quantidade seria melhor para visualizar as

bandas protéicas.

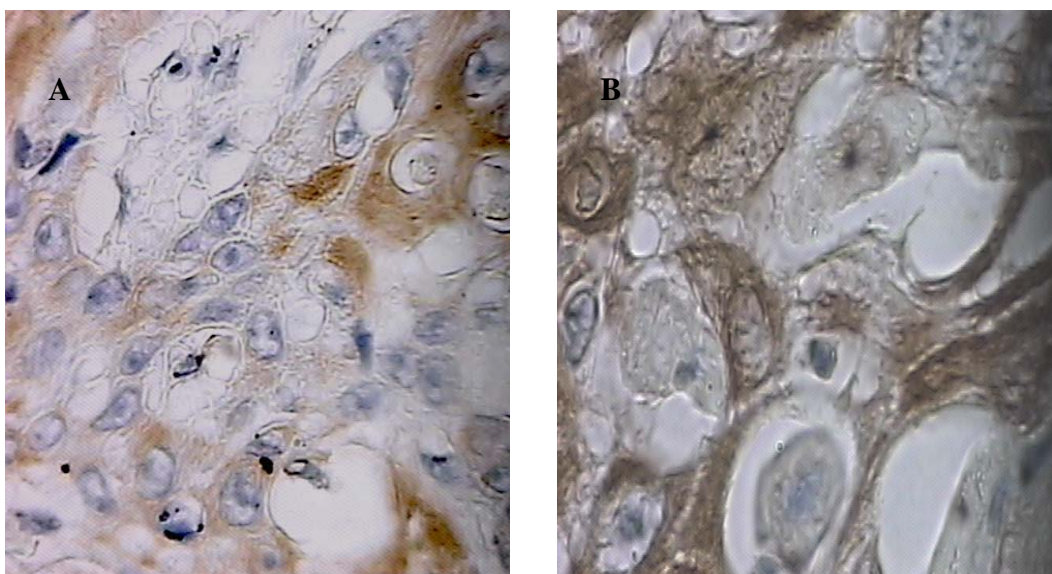


Figura 2: A e B – Epidermóide bucal MV cauda medial diluição 1:50 (40 x) barra= 1cm – 502,8 µm.

Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

O gel de poliacrilamida (permitiu a visualização das proteínas presentes na amostra de tumores epidermóides bucais e sua quantificação. Depois de realizar a aplicação das amostras no gel e a corrida, foi possível observar uma superexpressão de uma banda protéica com massa molecular relativa de aproximadamente 58 kDa (Figura 3). Porém, para esse estudo não foi realizado a pesquisa em bancos de dados de qual proteína que tenha essa

massa molecular relativa e pode estar presente em tumores epidermóides bucais.

Transferência eletroforética do gel para a membrana de nitrocelulose- “Western blot” (TOWBIN *et al.*, 1979)

Foi realizado um controle positivo (aplicação do anticorpo primário na membrana de nitrocelulose) e um controle negativo (sem aplicação do anticorpo primário na membrana). Foi obtido como resultado no controle positivo

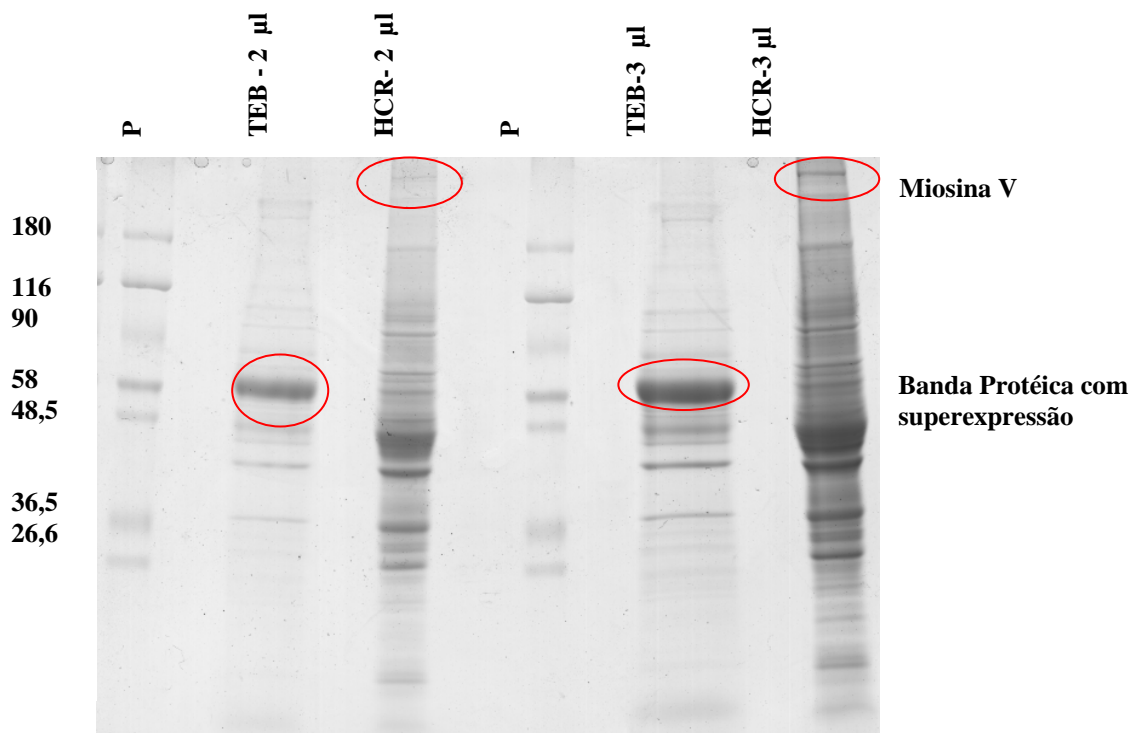


Figura 3: Gel de eletroforese da amostra de tumor epidermóide bucal e padrão de massa molecular relativa em kDa (P).

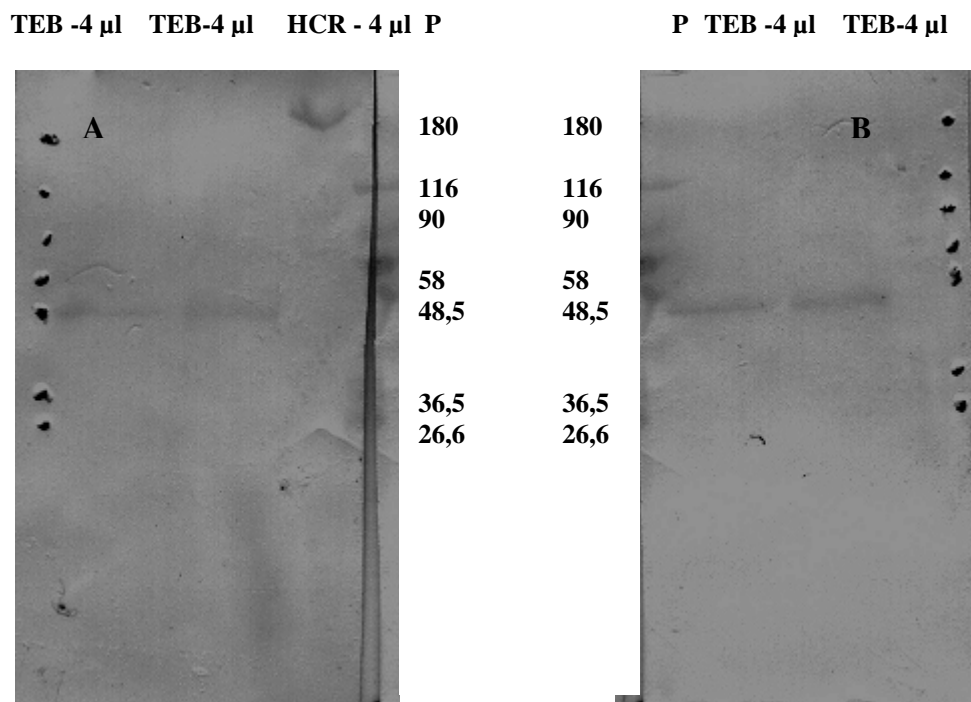


Figura 4: Membrana de nitrocelulose revelada com reagente NBT/BCIP, com padrão de massa molecular relativa em kDa (P) e a banda referente à proteína inespecífica

a marcação de miosina V na amostra de homogeneizado de rato e a marcação inespecífica de uma banda na amostra de tumor epidermoide bucal (massa molecular relativa próxima de 48,5 kDa) e no controle secundário também houve a marcação inespecífica da mesma banda na amostra de tumor epidermoide bucal (massa molecular relativa próxima de 48,5 kDa).

A presença de miosina V em tumores epidermóides bucais não foi constatada, pois, o método de Western blot utilizado não era sensível o suficiente para detectar essa proteína ou, ainda a miosina V pode realmente não estar super expressa nesse tipo de tumor.

Conclusão:

O objetivo inicial desse estudo era estudar a imunolocalização de miosina V em tumores epidermóides bucais e glândulas salivares, porém no decorrer da realização desse trabalho foi realizado somente testes em tumores epidermóides bucais. O número de pacientes acometidos com esse tipo de tumor era maior.

Portanto, em relação aos tumores epidermóides bucais foi verificado que a miosina V não se encontra super expressa e não está diretamente ligada com a progressão do tumor, no entanto, os testes de imunohistoquímica e Western Blot devem ser repetidos com alguns reajustes

nas técnicas e a utilização de Kits mais sensíveis.

O estudo ainda não foi concluído, pois, falta identificar a proteína de 58 Kda presente no gel de eletroforese e os mesmos experimentos citados neste artigo devem ser realizados com os tumores de glândula salivar.

Agradecimentos:

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia.

À equipe de cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia

Ao setor de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Referências Bibliográficas:

ADAMS, J.M.; CORY, S., **Apoptosomes: engines for caspase activation.** Current Opinion in Cell Biology, v.6, p.715-720, 2002.

BITTENCOURT M. **Validação do Exame Clínico Meticuloso (ECM) para triagem de câncer bucal.** RFO. 2001; 6(1): 71-7.

BRADFORD M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal Biochem., v. 7, p 248-54, 1976

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer – INCA, Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA, p 92, 2004.

COTRAN, R.S., KUMAR, COLLINS, T. Robbins: **Patologia Estrutural e Funcional**, 6^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1251, 2000.

DICK T, RAY K, SALZ H. K., CHIA W., **Cytoplasmic dynein (ddlc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in Drosophila melanogaster** . Molecular and Cellular Biology, v. 16, p. 1966-77. 1996.

ESPINDOLA, F. S.; CHENEY, R. E.; KING S. M. SUTER, D. M.; MOOSEKER. M. S., **Myosin-V and dynein share a similar light chain.** Molecular biology of the Cell, v. 7, p. 102-117, 1996.

ESPINDOLA, F.S.; SUTER, D.M.; PARTATA, L.B.E.; CAO, T.; WOLENSKI, J.S.; CHENEY, R.E.; KING,

S.M.; MOOSEKER, M.S., **The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN.** Cell Motility and the Cytoskeleton, v.47, p. 269-281, 2000.

FAN J, ZHANG Q, TOCHIO H, LI M, ZHANG M., **Structural basis of diverse sequence-dependent target recognition by the 8 kDa dynein light chain.** Journal of Molecular Biology, v.306, p.97-108, 2001.

FAN, J.S.; ZHANG, Q.; TOCHI, H.; ZHANG, M., **Backbone dynamics of the 8kDa dynein light chain dimer reveals molecular basis of the protein's functional diversity.** Journal of Biomolecular NMR, v.23, p. 103-114, 2002.

GREEN, D.R.; KROEMER,G., **The pathophysiology of mitochondrial cell death.** Science,v.305, p.626-629, 2004.

HAMADA GS, BOS AJ, KASUGA H, HIRAYAMA T. Comparative Epidemiology of Oral Cancer in Brazil and India. Tokai J Exp Clin Med, v 16, p.63-72, 1991.

INCA. Condutas do INCA. Revista Brasileira de Cancerologia, Tumores das Glândulas Salivares. Rio de Janeiro: v.48 (1), p 9-12 ,2002.

JACOBS C. **Head ad neck oncology.** Boston: Nijhoss; 1987.EY, S.R.; SNYDER, S.H., **PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase.** Science, v.274, p.774-777, 1996

LA VECCHIA C. Epidemiology and prevention of cancer. **Oral Oncol.** 1997; 33(5): 302-12.

LAEMMLI,U.K.;FAVRE, M. **Maturation of the head of bacteriophage T4.** Journal of Molecular Biology, v. 80, p. 575-599, 1973.

LEITE ICG, KOIFMAN S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Eur j cancer part B Oral oncol.** 34: 347-52.

LETAI, A.; BASSIK, M.C.; WALENSKY, L.D.; SORCINELLI, M.D.; WEILER,S.; KORSMEYER, S.J., **Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as**

prototype cancer therapeutics. Cancer Cell, v.3, p.183-192, 2002.

MOORE, D.F., WU, Y.; SHIH, W.J., **Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737.**The Journal of clinical investigation, v.117, p.112-121, 2007.

PUTHALAKATH, H.; HUANG, D.C.; O'REILLY, L.A.; KING, S.M.; STRASSER, A., **The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex.** Molecular Cell, v.3, p. 287-296, 1999.

PUTHALAKATH, H.; VILLUNGER, A.; O'REILLY, L.A.; BEAUMONT, J.G.; COULTAS, L.; CHENEY, R.E.; HUANG, D.C.; STRASSER, A., **Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis.** Science, v.293, p.1784-1785, 2001.

RAPPORT,A. **Câncer de boca.** 1ªed. Pancast: São Paulo, 1997, 213p;

RECK-PETERSON, S.L.; PROVANCE, D.W.; MOOSEKER, M.S.; MERCER,

J.A., **Class V myosins**, *Biochim. Biophys. Acta*, v.149, p.36-51, 2000.

REED, E.; ALTAHA, R; ABRAHAM, J., **Breast and ovarian cancer genetics and prevention**. *The West Virginia medical journal*,v.5, p.187-91, 2003.

SMELTZER S. C.; BARE B.G. *Tratado de Enfermagem médico cirúrgica*. 8^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.

WATTRE P. **Apoptose et virus (hormis les retrovirus)**. *Revue Française des Laboratoires* 1999; 311: 43-9.

STRASSER, A.; COULTAS, L., **The molecular control of DNA damage-induced cell death**. *Apoptosis: an*

international journal on programmed cell death, v.6, p.491-507, 2000.

TOWBIN H, STAEBELIN T, GORDON J. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 76(9), p 4350-4, 1979.

VADLAMUDI, R.K.; YANG, Z.; KUMAR, R., **Dynein light chain 1 phosphorylation controls macropinocytosis**. *The Journal of biological chemistry*, v.280, p.654-659, 2004.