



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p53 E pRb EM
CACARCINOMA ESCAMOCELULAR E PAPILOMAS ORAIS
PELO MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO

LEILA BRITO DE QUEIROZ

Salvador - Bahia
2006

LEILA BRITO DE QUEIROZ

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p53 E pRb EM
CACARCINOMA ESCAMOCELULAR E PAPILOMAS ORAIS
PELO MÉTODO IMUNO-HISTOQUÍMICO**

Dissertação apresentada no programa de Pós-graduação em Imunologia, Instituto de Ciências as Saúde (ICS), Universidade Federal da Bahia (UFBA), como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Imunologia.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Silvia Sardi
Co-orientadores: Prof^a. Dr^a Conceição
M. P. Queiroz e Gúbio Soares Campos

Salvador- Bahia
2006

“E aprendi que se depende sempre de muita diferente gente, toda pessoa sempre é as marcas das lições diárias de outras tantas pessoas...”

Gonzaguinha

AGRADECIMENTOS

Chegou o momento de expressar os sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus

Por mais uma etapa finalizada. Por cada aprendizado, pela maturidade adquirida durante esse processo, pelas novas descobertas, pelo desejo de explorar novos horizontes e pela felicidade que sinto hoje por ter a certeza de ter escolhido o caminho certo!

À Prof^a Silvia Sardi e ao Prof. Gúbio Soares Campos

Agradeço pela confiança em me acolher no Laboratório de Virologia e tornar possível a realização deste sonho. Agradeço pelo meu despertar para a área de pesquisa, que hoje muito me fascina. Obrigada pela orientação e pelos conhecimentos adquiridos.

À Prof^a Conceição Queiroz

Pelo enorme esforço na realização desta dissertação, pelo aprendizado e incentivo.

Aos meus pais, irmãos e familiares

Pelo suporte a mais uma conquista na minha vida. Vocês são minha referência, meu porto seguro. Obrigado pela paciência e estímulo. Amo vocês!!!

À Prof^a Mônica Beltrame

A grande responsável pelo meu ingresso na vida acadêmica. Agradeça a você por acreditar no meu potencial, por me incentivar, por ser meu exemplo!

Ao meu namorado Ricardo Ribeiro

Que trouxe luz e brilho a minha vida, um amor especial! Agradeço a Deus por você ter estado ao meu lado durante este processo! Pelo cuidado, pelo carinho, pela atenção e pelas referências digitadas.

À minha amiga e colega Mônica Franca Ribeiro

Obrigada pelo exemplo, confiança, pelas noites em claro, por sempre poder contar com você durante os momentos mais difíceis. Por ser minha referência profissional. Te adoro!

Aos meus amigos,

Meu muito obrigado pela compreensão quanto ao afastamento e ausência em momentos especiais

Ao Laboratório Silvany Studart e ao Prof. Eduardo Studart

Por colaborar com o desenvolvimento desta dissertação, cedendo as amostras, além da enorme contribuição na leitura das lâminas de imuno-histoquímica.

As Prof^{as}. Eneida Barros e Lucila Machado

Pela compreensão e apoio neste momento difícil, por compreenderem meus momentos de ausência.

Aos amigos e colegas desta etapa

Adriano Monteiro, Maria Clara Diniz, Andréa Padre, Márcia Cristina, Cyntia Cajado por dividirem comigo momentos nesta rica caminhada.

À Tatiana Cheto

Pela paciência e disponibilidade em transmitir conhecimentos a cerca da técnica de Imuno-histoquímica. Uma contribuição sem tamanho para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Roberto Meyer

Por sempre estar acessível e disposto a ajudar.

Aos colegas de Laboratório

Camila Brandão, Juliana Torres, Michael Freitas, Andréa Padre.

Às colegas e Prof^{as}. Dellane Tigre e Karina Serravalle

Pela enorme contribuição durante a realização do PCR

As Prof^{as}. Tarsila Freitas e Gabriela Botelho, ao Prof. Marcelo Filadelfo e aos colegas de trabalho

Pelos artigos e materiais e por sempre oferecerem ajuda durante o desenvolvimento da dissertação.

Ao Prof. Manoel Tachard

Pelo carinho, pelo apoio, por me receber de braços abertos na equipe de Microbiologia da FBDC.

À colega e Prof^a. Soraya Trindade e à Prof^a Lilia F. M. Costa
Pelo apoio e receptividade em um momento muito difícil

À Sra Dilcéa Oliveira, secretária do PPGIM
Pelo apoio e paciência, palavras de incentivo e pela dedicação.

Ao Prof. Márcio Campos
O grande incentivador na elaboração da dissertação.

Ao Prof. Rogério Santos e Sr. José Bouzas Araújo Filho
Pela análise estatística.

Aos Professores do PPGIM
Pelos conhecimentos adquiridos

Aos professores da FBDC e ao Prof. Urbino Tunes
Pela oportunidade e confiança que me foi dada para fazer parte desta grande equipe que é a FBDC.

À Prof^a Susie Vieira
Pelo esclarecimento de algumas dúvidas e pela ajuda prestada nesta fase final.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Marcadores moleculares do ciclo celular.....	18
2.1.1 O ciclo celular.....	18
2.1.2 Proteínas Regulatórias do ciclo celular.....	20
2.2 Carcinoma de Células Escamosa Oral e os processos moleculares da Carcinogênese.....	25
2.3 Papiloma e lesões orais induzidas pelo HPV.....	32
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 Objetivo Geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Seleção das amostras.....	40
4.2 Aspectos Éticos.....	40
4.3 Imuno-histoquímica para detecção da p53 e pRb.....	41
4.3.1 Preparo das lâminas e Desparafinização.....	41
4.3.2. Recuperação antigênica.....	41
4.3.3 Bloqueio da peroxidase endógena.....	42
4.3.4 Detecção das proteínas p53 e pRb.....	42
4.3.5 Revelação da reação.....	43

4.3.6 Leitura da expressão da p53 e pRb.....	43
4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	44
4.4.1 Desparafinização dos cortes.....	44
4.4.2 Extração do DNA.....	45
4.4.3. Amplificação do DNA viral.....	46
4.4.4 Leitura do PCR.....	47
4.5 Análise Estatística.....	47
5. RESULTADO.....	48
5.1 Resultado da Imuno-histoquímica.....	48
5.2 Resultado do PCR.....	59
5.3 Correlação entre expressão das proteínas p53 e pRb e positividade para HPV.....	59
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

G1	gap 1
S	Síntese
G2	gap 2
M	Mitose
CDK	Quinase dependente de ciclina
CKI	Inibidor de quinases dependentes de ciclina
D-CDK2	Complexo ciclina – quinase dependente de ciclina 2
D-CDK4	Complexo ciclina – quinase dependente de ciclina 4
D-CDK6	Complexo ciclina – quinase dependente de ciclina 6
p53	Fosfoproteína com peso molecular de 53kDa
pRb	Proteína Retinoblastoma
kDa	Quilodaltons
UV	Ultravioleta
E2F	Fator de Transcrição E2F
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
HPV	Papilomavírus Humano
LCR	Região longa de controle
PCR	Reação de Cadeia em Polimerase
T/A	Temperatura ambiente
RA	Recuperação antigênica

DAB	Diaminobenzidina
Anti- IgG	Anti Imunoglobulina isotipo G
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
rpm	Rotações por minuto
µm	Micrômetros
V	Volt
pb	pares de base
Tp53	Gene codificador da proteína p53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil das amostras selecionadas

Tabela 2. Seqüência de nucleotídeos e *primers*

Tabela 3. Freqüência da imunexpressão da p53 de acordo com o diagnostico histológico.

Tabela 4. Freqüência da imunexpressão da pRb de acordo com o diagnostico histológico

Tabela 5. Freqüência da imunexpressão da p53 de acordo com os escores e com o diagnóstico histológico.

Tabela 6: Freqüência da imunexpressão da pRb de acordo com os escores e com o diagnóstico histológico

Tabela 7: Freqüência da imunexpressão da p53 de acordo com o grau de diferenciação do carcinoma

Tabela 8: Freqüência da imunexpressão da pRb de acordo com o grau de diferenciação do carcinoma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: As fases do ciclo celular – Adaptação: DIAS Cancer Research, v. 65, p. 2260 – 2268, 2005.

Figura 2: O ciclo celular e o controle regulatório, – Adaptação: DIAS Cancer Research, v. 65, p. 2260 – 2268, 2005.

Figura 3: O genoma do HPV-16 – Adaptado GUTIÉRREZ, E.I.C. ; GARZA, C.H.L. ;Revista Salud Publica y Nutricion, v. 2, n 2, 2001.

Figura 4: Imunoexpressão da p53 escore 1 em tecido histologicamente normal.

Figura 5: Imunoexpressão da p53 escore 1 em carcinoma bem diferenciado.

Figura 6: Imunoexpressão da p53 escore 2 em carcinoma pouco diferenciado.

Figura 7: Imunoexpressão da pRb escore 1 em tecido histologicamente normal.

Figura 8: Imunoexpressão da pRb escore 1 em carcinoma bem diferenciado.

Figura 9: Imunoexpressão da pRb escore 2 em carcinoma bem diferenciado

Figura 10: Imunoexpressão da p53 de acordo com o diagnóstico histopatológico

Figura 11: Imunoexpressão da pRb de acordo com o diagnóstico histopatológico

Figura 12: Distribuição da p53 de acordo com o diagnóstico histopatológico

Figura 13: Distribuição da pRb de acordo com o diagnóstico histopatológico

Figura 14: Distribuição da expressão da p53 de acordo com o grau de diferenciação do carcinoma.

Figura 15: Distribuição da expressão da p53 de acordo com o grau de diferenciação do carcinoma

Figura 16: Detecção do DNA de HPV em gel de agarose a 2%

RESUMO

A progressão do ciclo celular é regulada por uma variedade de proteínas, como as quinases dependentes de ciclinas, inibidores de quinases dependente de ciclinas e proteínas supressoras de tumor, como a p53 e pRb. Alterações na expressão de proteínas supressoras de tumor podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de processos neoplásicos malignos. O HPV, vírus epiteliotrópico, considerado agente causal do câncer de colo de útero produz oncoproteínas E6 e E7 capazes de modificar o comportamento celular das proteínas p53 e pRb, respectivamente. A proposta deste estudo foi avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e pRb de biópsias em blocos parafinados (n=56) de carcinoma escamocelular (n=31), papiloma orais (n=19) e tecido histologicamente normal (n=6) e associar os achados à detecção do HPV pelo método de PCR. A imunoexpressão foi avaliada de acordo com a marcação nuclear protéica, em escores 0,1, e 2 (imunoexpressão até 10%; entre 10% e 50% e acima de 50%, respectivamente). Nos Carcinomas, a p53 estava expressa em 61,3% dos casos, assim como para pRb. Nas 19 amostras de papilomas, 5,3% e 26,3% foram positivos para expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e pRb, respectivamente. Nos tecidos normais, em 50% houve imunoexpressão da p53 e em 16,7% da pRb. Foi estatisticamente significativa a correlação entre a detecção da proteína p53 e a natureza da neoplasia ($p=0,000$), assim como para análise da proteína pRb foi estatisticamente significativa a diferença entre os *ranks* médios do epitélio normal e carcinoma ($p=0,014$) e papilomas e carcinomas ($p=0,003$). De acordo com o grau de expressão, o escore 2 (superexpressão) para p53 e pRb foi associado ao desenvolvimento de neoplasias malignas, não sendo este escore detectado nas lesões papilomatosas ou em tecidos histologicamente normais. O presente estudo não permitiu definir o associação do HPV com a imunoexpressão das proteínas p53 e pRb em lesões malignas e benignas na cavidade oral, em função do pequeno número de amostra com resultados positivos.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica, p53, pRb, HPV, PCR, Carcinoma Escamocelular Oral

ABSTRACT

The cell cycle progression is regulated by proteins like the cyclin dependent kinases, cyclin dependent kinases inhibitors and tumour suppressor proteins like, p53 and pRb. Alterations of the tumour suppression proteins can be responsible for the development of malignant processes. The HPV, a epitheliotropic virus, is associated with cervical cancer and encodes two oncoproteínas E6 and E7, that induce cellular transformation binding to the p53 and pRb respectively. In this study we proposed to evaluate the immunohistochemistry expression of the p53 and pRb proteins from paraffin embedded tissues of oral carcinoma (n=31), oral carcinoma (n=19) and normal tissue (n=6) and associate the results with the detection of HPV DNA by PCR. The immunoexpression of the nuclear proteins was scored according the percentation of positive cells in score 0, 1 and 2 (< 10%, , between 10% and 50% and more than 50% of immunoexpression, respectively). In the cases of carcinoma the p53 and pRb were both expressed in 63,3%. In the samples of papillomas, 5,3% and 26,3% were positive for the immunoexpression of p53 and pRb, respectively. In normal tissue 50% was positive for p53 and 16,7% for pRb. Was found significant correlation between the detection of p53 and pRb and the diagnosis of benign or malignant lesions (p=0,000). It was also significant the correlation between the ranks for detection of pRb in carcinoma and normal tissues. The protein overexpression (score 2) was associated with the development of malignant neoplasia. In this study was not possible to associate the immunoexpression of the proteins with the detection of HPV,

Keyword: HPV, p53, pRb, immunohistochemistry, PCR, Oral Cell Squamous Carcinoma

1. INTRODUÇÃO

A progressão do ciclo celular é regulada por uma variedade de proteínas, que permitem a ocorrência e o ordenamento dos eventos envolvidos na proliferação da célula, como reparo, duplicação e separação cromossômica (ALBERTS *et al.*, 2002). Dentre essas proteínas estão as quinases dependentes de ciclinas, as ciclinas e as p53 e pRb, que monitoram a integridade dos cromossomos e a execução correta das diferentes fases do ciclo celular (CORDON-CARDO, 1995).

As quinases dependentes de ciclinas e as ciclinas formam heterodímeros e atuam fosforilando proteínas do ciclo celular, determinando, desta forma, a parada ou a progressão deste (ALBERTS *et al.*, 2002). A p53 é uma proteína supressora de tumor e age como fator de transcrição, se ligando a seqüências específicas no DNA. A ativação da p53 induz a parada do ciclo celular frente a fatores que danificam o material genético, permitindo o reparo do DNA antes da progressão do ciclo. Em certas condições a ativação da p53 pode resultar na apoptose celular (LEVINE, 1991). Segundo Classon e Harlow (2002), Sherr (1996) e Grinstein (2006) a pRb é também uma proteína supressora de tumor, que na forma ativa está ligada ao fator de transcrição E2F, inibindo a ação transcricional deste. A pRb atua na fase G1, controlando a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência da célula.

A perda de função das proteínas regulatórias pode resultar na deficiência ou perda do controle do ciclo celular, conduzindo a célula a um processo de proliferação desregulada, eventualmente propiciando o desenvolvimento de uma neoplasia de caráter maligno (LEVINE, 1991).

Segundo Sakai e Tsuchida (1992), o gene Tp53 é frequentemente afetado através de perda de alelos e mutações de ponto na maioria dos cânceres humano, sendo também associado à etiologia dos carcinomas espinocelulares da cavidade oral. Da mesma forma, a perda da função da pRb tem sido associada ao desenvolvimento neoplasias epiteliais malignas (LOCKER, 1995, CHETTY *et al.*, 1997).

A proteína p53, em seu estado mutado, tem uma sobrevivência maior, sendo, desta forma, facilmente detectada pelo método de imuno-histoquímica (WONG, 1998). O método de Imuno-histoquímica também permite a detecção da expressão da pRb em células individuais e em populações específicas de células em secções teciduais (BENEDICT *et al.*, 1990; GERADTS *et al.*, 1994).

Segundo Adams e Kaelin (1995), existem vários vírus pequenos de DNA capazes de interferir no processo de ciclo celular, desregulando-o. As oncoproteínas E6 e E7 produzidos pelo HPV interagem com as proteínas supressoras de tumor p53 e pRb, respectivamente. Essas interações alteram as funções das proteínas p53 e pRb, resultando em replicação alterada do DNA e atividade transcricional descontrolada do E2F (VOUSDEN, 1995; KE *et al.*, 1999). O HPV é considerado agente causal inequívoco do câncer de colo de útero, porém na cavidade oral, a relação causal deste vírus com o desenvolvimento de neoplasias malignas ainda é controverso.

O presente estudo objetivou analisar a expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e pRb em carcinomas escamocelulares e papiloma orais e associar os achados de expressão à presença do papilomavírus humano.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Marcadores moleculares do ciclo celular

2.1.1 O ciclo celular

As células se reproduzem pela duplicação de seus conteúdos e então, dividem-se em duas. Durante o processo de produção de células-filhas geneticamente idênticas, o material genético precisa ser fielmente replicado e o citoplasma segregado em duas células. Os eventos nucleares e citoplasmáticos são perfeitamente coordenados e ocorrem em estágios específicos, através do ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 2002).

O ciclo celular é composto de 4 estágios: G1, S, G2 e M. Na fase G1 (*gap 1*) há um aumento de tamanho celular e a célula se prepara para a replicação do material genético. Após essa fase, há uma primeira parada do ciclo (*checkpoint R*), quando é verificada a integridade genômica. Durante este evento qualquer anormalidade da informação genética que seja detectada, interrompe a progressão do ciclo até que o reparo seja realizado. A replicação, propriamente dita, ocorre na fase S (síntese) e permite que a célula duplique precisamente seus cromossomos. Após a replicação cromossômica inicia-se a fase G2 (*gap2*), durante a qual a célula se prepara para a fase M (mitose), quando a célula-mãe, aumentada, finalmente divide-se, para produzir duas células-filhas, com igual número de cromossomos (ALBERTS *et al.*, 2002; KASTAN, 1997) (Figura 1).

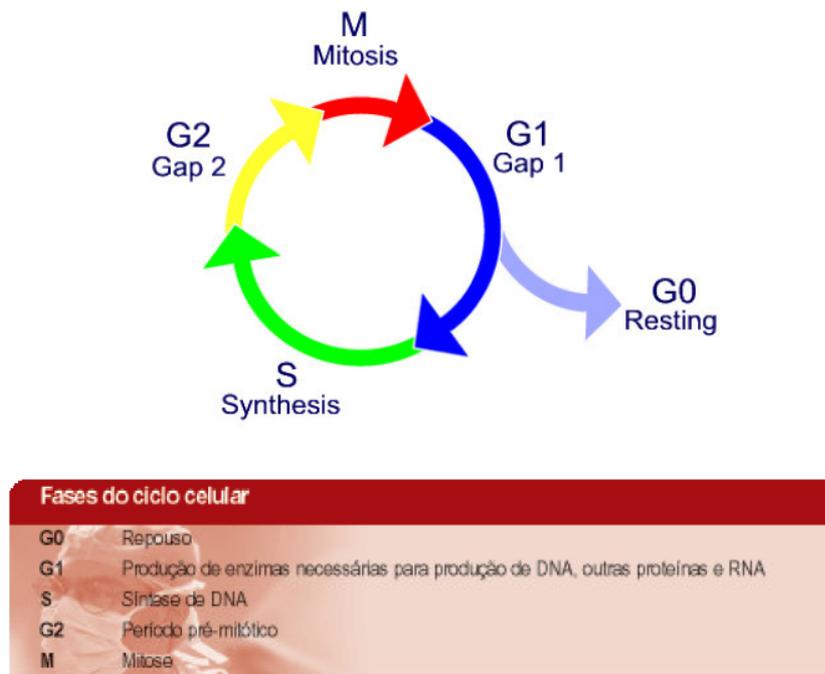


Figura 1: Fases do ciclo celular. DIAS, 2005

Para que o processo de divisão ocorra, alguns eventos seqüenciados necessitam ocorrer. O primeiro passo é a ligação de um fator de crescimento a um receptor específico na membrana plasmática que, através de seus domínios internos, ativa proteínas transdutoras de sinais presentes no citoplasma. A transmissão de sinais pelas proteínas transdutoras até o núcleo ativam proteínas regulatórias nucleares, dando início à progressão do ciclo celular. São conhecidas aproximadamente 50 proteínas que atuam como fatores de crescimento, liberadas por vários tipos celulares, de acordo com as necessidades do organismo. As células que possuem o receptor específico para um determinado fator de crescimento serão iniciadas no ciclo, enquanto as que não expressam este receptor em sua superfície permanecerão inativas (ALBERTS *et al*, 2002; ZAHA, FERREIRA, PASSAGLIA, 2003; KUMAR, FAUSTO e ABBAS, 2005; DIAS, 2005).

2.1.2 Proteínas Regulatórias do ciclo celular

A progressão através do ciclo celular é regulada por uma variedade de proteínas que permitem o correto ordenamento dos eventos de reparo, duplicação e separação cromossômica. Essas proteínas, denominadas de quinases dependentes de ciclina (CDKs), nas formas ativas, envolvem a formação de complexos com proteínas específicas, conhecidas como ciclinas (DIAS, 2005). O complexo CDK/ciclina coordena os eventos do ciclo celular através da fosforilação de proteínas, processo este que pode determinar a progressão do ciclo. A proteína pRb, por exemplo, que no estado ativado se encontra hipofosforilada, pode ser fosforilada pelo complexo CDK/ciclina, permitindo, desta forma, a progressão do ciclo. A quantidade das ciclinas varia periodicamente durante o ciclo celular, sendo essas proteínas sintetizadas somente em fases específicas do ciclo, de acordo com as necessidades celulares, sendo degradadas após utilização. (ALBERTS, *et al.*, 2002; BRUGAROLAS, *et al.*, 1998; NICULESCU *et al.*, 1998; DIAS 2005).

A regulação da formação do complexo CDK/ciclina é realizada por inibidores de ciclinas dependentes de quinases (CKI), que através do bloqueio da atividade das quinases, promovem a parada do ciclo celular. Os CKI da família p21, como as p21^{wap1/cip1}, p27^{kip1}, p57^{kip2} são inespecíficas, atuando sobre diversos tipos de complexos CDK/ciclina. Já as CKI da família INK4, como as p16^{ink4a}, p18^{ink4c}, p19^{ink4d}, são específicas sobre os complexos CDK/ciclina dos tipos D-CDK4 e D-CDK6, que atuam em G1. Outras proteínas de controle negativo do ciclo celular são as fosfatases, que atuam na fosforilação de CDK e desfosforilação dos complexos CDKs/ciclinas, tornando-os inativos e as proteínas do complexo ubiquitina, que

degradam as ciclinas e outras proteínas e assim, impedem a progressão do ciclo celular (DIAS, 2005). A ação dessas proteínas repercute na atividade de proteínas inibitórias do ciclo celular ou proteínas supressoras de tumor, como a p53 e pRb (ALBERTS *et al.*, 2002; DIAS, 2005; De ROBERTIS E HIB, 2001; ZAHA, FERREIRA e PASSAGLIA, 2003).

Muitas proteínas supressoras de tumor como a p53 e a pRb têm sido estudadas. A p53, proteína intensamente avaliada, desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade genômica (SMITH *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1993; FUNK *et al.*, 1992)

O TP53 é um gene supressor de tumor descrito pela primeira vez em 1979 e localiza-se no braço curto do cromossomo 17 na região 3.3 e compreende 11 exons. Codifica uma fosfoproteína nuclear nomeada por seu peso molecular de 53kDa (p53) com 393 aminoácidos, existindo na sua forma ativa como um tetrâmero. Esta proteína tem um papel muito importante no crescimento e proliferação das células através de ações de controle do ciclo celular (FINLAY, HINDS e LEVINE, 1989; BRENNAN e SYRJÄNEN, 2003; HARRIS, 1996; WANG e HARRIS 1997, WHYTE, BROTON, SHILLITOE, 2002).

O TP53 é ativado em resposta a sinais de stress celular, especialmente induzido por danos ao DNA (radiação UV, gama ou X, carcinógenos, agentes alquilantes, micotoxinas, depleção de ribonucleotídeos, inibidores de topoisomerasas), hipóxia e rompimento de adesão celular (PLUQUET e HAINAUT, 2001). A ação da p53 promove a parada do ciclo celular na fase G1, que pode ter duração longa ou temporária, antes da replicação do DNA (fase S), permitindo, desta

forma o reparo do DNA danificado. Além disso, em casos nos quais o reparo do DNA não é possível, a p53 induz a apoptose, através da sinalização para proteínas indutoras de apoptose, como o *bax*, *bcl-2* e *c-myc*, resultando na eliminação de células com informações genéticas inapropriadas (JUAN, SHIA e CHEN, 2000; PILLAI e NAIR, 2000; MOLL e SCHRAMM, 1998; CADWELL e ZAMBETTI, 2001; LEVINE, 1997; GIACCIA e KASTAN, 1998; BATES e VOUSDEN, 1996).

A p53 é constitutivamente expressa em todos os tipos celulares, mas não se acumula devido à rápida degradação por proteassomo, por estar associada a uma ligase de ubiquitina (Mdm2). Em resposta a um estímulo, a p53 é fosforilada em múltiplos sítios se dissociando do fator regulador Mdm2 e conseqüentemente, ocorre acúmulo na célula (APELLA e ANDERSON, 2000)

Após a ativação da p53, ocorre a indução da transcrição de alguns genes inibidores de quinase dependente de ciclina, como p21^{wap1/cip1}, resultando na parada do ciclo celular em G1. A importância da p21^{wap1/cip1} como mediador das funções da p53 é suportada pela observação que células deficientes em p21^{wap1/cip1} apresentam defeito na parada do ciclo celular em resposta a danos ao DNA. O efeito imediato da indução da p21^{wap1/cip1} é a inibição da fosforilação mediada pelos complexos ciclina-CDK4 e ciclina-CDK6 e conseqüentemente da pRb, induzindo a permanência da célula no estágio G1 (DIAS, 2005; EL DEIRY *et al.*, 1993; GRANA e REDDY, 1995; HUNTER e PINES, 1994; BÁLINT e VOUSDEN, 2001; VOGELSTEIN, LANE e LEVINE, 2000)(Figura.2).

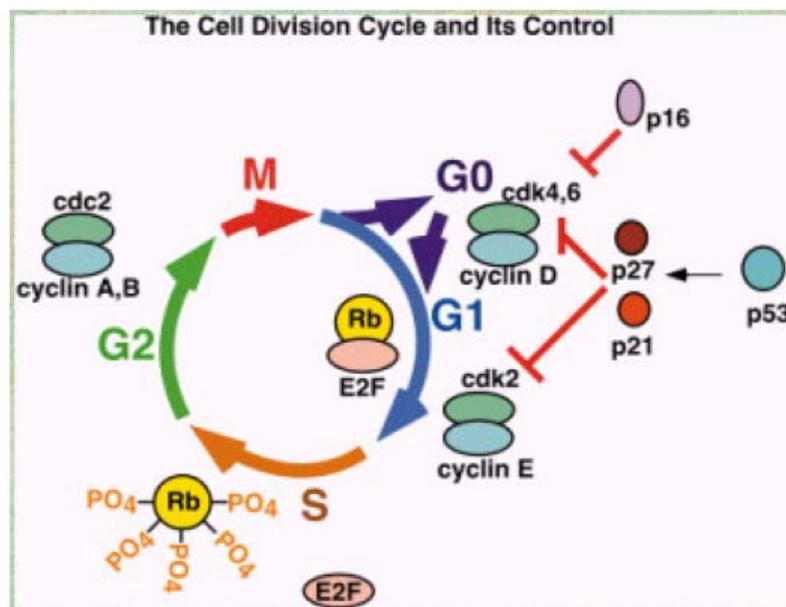


Figura 2: O ciclo celular e o processo de regulação. DIAS, 2005.

Outro gene supressor de tumor bastante estudado é a Rb, localizado no cromossomo 13, que contem 27 exons e codifica a fosfoproteína nuclear denominada pRb ou p105Rb. No estado ativo, a pRb se encontra hipofosforilada e atua como repressor da progressão das células da fase G1 para a fase S do ciclo celular. No início da fase G1 ocorre a síntese da ciclina D, que se liga as CDK4 e CDK6, formando dois complexos. Mais tardiamente, ocorre a síntese da ciclina E, que se liga a CDK2. Estes três complexos irão atuar na fosforilação da proteína pRb (KAELIN, 1997; HERWIG e STRAUSS, 1997; ALBERTS *et al*, 2002; ZAHA, FERREIRA, PASSAGLIA, 2003). Ao entrar na fase S a forma fosforilada da proteína se torna mais abundante, o que persiste durante as fases S, G2 e M (LUDLOW *et al.*, 1993).

A pRb, na fase G1, encontra-se ativada e em quantidade elevada no núcleo das células de mamíferos, estando ligada e inibindo a função de uma série de proteínas regulatórias que favorecem a progressão do ciclo, como ao fator de transcrição E2F. Quando a célula é estimulada a se dividir, a pRb é fosforilada pelos complexos CDKs/ciclina, torna-se inativa e libera o fator E2F. A proteína de regulação gênica E2F é responsável pela transcrição de vários genes cujos produtos são necessários para que a célula progrida para a fase S. (ROSENBLATT, 2005; DIAS, 2005; KUMAR, FAUSTO e ABBAS, 2005; ALBERTS *et al*, 2002; ZAHA, FERREIRA, PASSAGLIA, 2003).

Muller *et al* (2001); Paramio *et al* (2000); Black e Azizkhan-Clifford (1999), apud HWNAG *et al.*, (2002), a E2F foi a primeira proteína celular identificada ligada à pRb. Existem 6 membros da família E2F como fator de transcrição, E2F-1 a E2F-6. As proteínas E2F regulam a atividade de promotores contendo sítios de ligação E2F e controlam diretamente a transcrição de genes envolvidos na replicação do DNA e no controle de crescimento celular, incluindo os genes *c-myc*, *b-myc*, *cdc-2*, genes codificadores das ciclinas A e E e de proteínas, como os da DNA polimerase α , PCNA e ribonucleotideo redutase (DIAS, 2005; ROSENBLATT *et al.*, 2005; ALBERTS *et al.*, 2002; ZAHA, FERREIRA e PASSAGLIA, 2003; KUMAR, FAUSTO e ABBAS, 2005; DE GREGORI *et al.*, 1997; HUET *et al.*, 1996; ZWICKER *et al.*, 1996);

A pRb pertence à família de proteínas da qual a p107 e p130 também fazem parte, por possuírem regiões com seqüências homólogas consideráveis. Qualquer uma dessas proteínas está apta a se ligar a um membro da família E2F de um modo

dependente do ciclo celular e regular negativamente a transcrição mediada por essas proteínas. A ação repressiva do E2F é sugerido em estudos nos quais foram alterados sítios de seus promotores, como no *b-myc*, *cdc-2* e ciclina E, que resultou em um aumento na quiescência celular e de células na fase G1 (LI *et al.*, 1993; DYSON, 1998)

CKIs como a p21^{wap1/cip1}, p57^{kip2} e a proteína p53 exercem controle sobre a ação da proteína pRb por bloquearem a atividade de quinase nos complexos ciclina-CDKs, impedindo que a célula saia do estágio G1 (ALBERTS *et al.*, 2002; ZAHA, FERREIRA, PASSAGLIA, 2003).

2.2 Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral e os Processos Moleculares da Carcinogênese

O Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO), também denominado Carcinoma Epidermóide ou Espinocelular representa mais de 90% de todos os tumores malignos que afetam a cavidade bucal, 38% dos tumores malignos de cabeça e pescoço, ocupando o sexto lugar entre os mais comuns em todo o mundo (NEVILLE *et al.*, 2004). Em alguns países em desenvolvimento, o câncer oral é a forma mais comum de malignidade, representando cerca de 40% de todos os cânceres (PISANI, PARKIN e FERLAY, 1993).

Clinicamente, o carcinoma epidermóide apresenta, nas fases iniciais, um aspecto variado, assemelhando-se a leucoplasia, eritroplasia ou eritroleucoplasia, sendo o lábio inferior, a borda lateral da língua e assoalho bucal os locais mais freqüentemente acometidos (TOMMASI, 2002; NEVILLE, 2004).

Histologicamente, o carcinoma escamoso de cavidade oral tem início na camada epitelial superficial com o aparecimento de células epiteliais malignas, caracterizado histopatologicamente por ilhas e cordões invasivos, que se mostram diferentes das células epiteliais normais e tem comportamento invasivo em direção ao tecido conjuntivo subjacente (NEVILLE, 2004).

Os agentes carcinogênicos envolvidos na etiologia do câncer de boca são principalmente o tabaco e o álcool, sendo estes incriminados como fatores iniciantes em torno de 90% dos casos (SHAFER, HINE e LEVY, 1985; FRANCESCHI *et al.*, 1999; MASHBERG *et al.*, 1993; KO *et al.*, 1995; NEVILLE, 2004; GILLISON *et al.*, 2000). Segundo Sugerman e Shillitoe (1997). O desenvolvimento de CCEO sem história prévia de exposição aos fatores de risco principais sugere a presença de outros agentes indutores, como predisposição genética, dieta e fatores biológicos, que podem resultar no escape dos mecanismos fisiológicos de controle da proliferação celular.

O desenvolvimento do CCEO é um evento de múltiplas etapas, tanto em nível fenotípico quanto genotípico, cuja incidência vem crescendo continuamente. Durante este processo, há um rompimento dos padrões regulatórios normais que regem as funções celulares básicas, como divisão, diferenciação e morte celular, resultando em aumento do tempo de vida celular, imortalização e transformação tumoral (KUMAR, FAUSTO e ABBAS, 2005; DeROBERTIS e HIB, 2001; JEFFRIES, EELES

e GOLDGAR, 1999). Esse evento se desenvolve através de estágios sucessivos, na qual há um acúmulo de mutações genéticas através de gerações celulares. Diferentemente de outras enfermidades, o câncer é resultante de um processo de proliferação descontrolada de uma única linhagem celular, que escapou do complexo sistema de controle regulatório do ciclo celular (RIVOIRE *et al.*, 2001; LOEB e LOEB, 2000). As proteínas envolvidas no controle do ciclo celular são codificadas por genes específicos. Qualquer mutação nesses genes ou alterações nas proteínas pode resultar em um descontrole do processo de proliferação celular, culminando no desenvolvimento de uma neoplasia maligna (LOEB e LOEB, 2000).

Duas classes de genes estão diretamente associadas ao processo de carcinogênese: os genes supressores de tumor e os oncogenes (DeROBERTIS e HIB, 2001). A inativação de genes supressores de tumor, através de mutações pontuais, ampliações, rearranjos e deleções e a ativação de oncogenes por amplificação estrutural, amplificação gênica, rearranjo cromossômico ou infecção viral, são fenômenos biológicos fundamentais na transformação de uma célula normal em uma célula neoplásica. Os oncogenes estão inativos ou são expressos em baixas quantidades nas células normais, sendo denominados protooncogenes. Dentre os principais oncogenes relacionados à carcinogênese oral os mais estudados são os *bcl-2*, *CCND*, *ERBB2*, *FGF3*, *HRAS* e *myc* (SMITH *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1993, KUMAR FAUSTO e ABBAS, 2005).

Embora em número reduzido, os genes supressores do tumor são vistos como os mais significativos na carcinogênese. Evidências surgiram em relação ao papel dos genes supressores de tumor Rb e da p53 na transformação neoplásica a partir do estudo com vírus. As proteínas transformadoras sintetizadas por vários vírus DNA

animais e humanos ligam-se e neutralizam as atividades inibidoras dessas proteínas. Assim, a oncogenicidade desses vírus pode ser parcialmente baseada na capacidade de inibir as funções das proteínas supressores de tumor (GLEICH e SALAMONE, 2002; KUMAR, FAUSTO e ABBAS, 2005).

Considerado como o “guardião do genoma humano”, por ser responsável pela manutenção da integridade genômica, o Tp53 é um dos genes de maior importância dentre os espectros de genes envolvidos na carcinogênese humana e, conhecimentos dos mecanismos de ação da p53 representam uma etapa fundamental para a compreensão dos aspectos biológicos envolvidos na progressão tumoral (SITTEL 1999; SMITH *et al.*, 1995; ZHANG, 1993).

A perda da função da p53 pode ocorrer de várias maneiras: através de associações com outras proteínas, alterações genéticas: como perdas de alelos, degradações e mutações (OLIVIER *et al.*, 2002; TODD, DONOFF e WONG 1997). Mutações somáticas do gene Tp53 têm sido encontradas nas diferentes formas dos tumores humanos em uma frequência de 50% a 70% (MOLL e SCHRAMM, 1998; CADWELL e ZAMBETTI, 2001, RIES *et al.* 1998; FRIEDRICH *et al.*, 2000; SHIMA *et al.*, 2000; HOLLSTEIN *et al.*, 1991) e podem ocorrer ou através de mutações pontuais ou através de deleções. Essas mutações podem resultar em alterações estruturais, inativando as atividades supressoras da proteína, que culminam na redução ou perda da expressão e função protéica. Quando mutada, a p53 falha na ativação p21^{wap1/cip1}, não promovendo, desta forma, a parada do ciclo (HOLLSTEIN *et al.*, 1991).

Segundo Hernandez-Bussard *et al.* (1999), apud Klumb e Cavalcanti Junior, 2002, ao contrário dos outros genes supressores de tumor que são inativados por

perda alélica, o gene Tp53 distingue-se pela alta freqüência de mutações. Segundo Bertek *et al* (1991), a maioria dessas mutações é do tipo *missense*, alterando a função normal da proteína p53 e como resultado dessas mutações dos tipos pontuais, a proteína tem meia-vida aumentada e se acumula em células tumorais.

Células com p53 inativadas demonstram ter uma vantagem em crescimento seletivo, pois falham na parada do ciclo celular, escapam do reparo a danos ao DNA e da apoptose, culminando em instabilidade genômica e acúmulo de mutações. Alterações nos genes codificadores da p53, associada à perda de função desta proteína, estão reportadas em 80% dos Carcinoma Escamocelular Oral (PARK e KANG, 2000; LEVINE 1997; GIACCIA e KASTEN, 1998; GUILLOUF *et al.*, 1995; LIN *et al.*, 1992).

Não sendo detectada, pelo método de imuno-histoquímica, na maioria dos tecidos normais, a p53 selvagem tem uma vida média de aproximadamente 6 a 20 minutos, entretanto esse tempo pode aumentar para 6 horas ou mais caso a proteína esteja mutada. As mutações gênicas são freqüentemente encontradas em 4 regiões altamente conservadas da p53, incluindo exons 5-9, tendo como conseqüência um aumento na estabilidade protéica por interferência do seu mecanismo de degradação, manifestado através de seus altos níveis detectados facilmente pelo método de imuno-histoquímica no núcleo das células (LEVINE, FINLAY e MOMAND 1991; UCHIDA *et al.*, 1995; LOYOLA, BORRA e ARAUJO, 1995; LAZARUS *et al.*, 1996).

A expressão aumentada da p53 detectada através do método de imuno-histoquímica é reportada e representada em muitos cânceres de cabeça e pescoço,

incluindo o CCEO (FAN et al 2006). Em estudos, Aguiar e Araújo (1997) examinaram 26 amostras de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço de arquivos, os quais apresentavam epitélio adjacente previamente graduado para atipia histológica. Os achados imuno-histoquímicos foram correlacionados com o grau histológico, para determinar se a expressão de p53 poderia ser utilizado no diagnóstico precoce do câncer bucal. Os autores encontraram expressão da p53 no epitélio adjacente à neoplasia em 96.1% das amostras. Treze das 23 amostras eram representadas por epitélio adjacente normal e todos foram positivos para p53, o que para os autores poderia representar cancerização de campo e alteração genética, mostrando um risco aumentado para o desenvolvimento de lesões múltiplas independentes, que podem se tornar malignas.

O gene supressor de tumor retinoblastoma foi o primeiro gene supressor a ser identificado e codifica a fosfoproteína pRb, que tem sido encontrada mutada ou deletada em vários tipos de tumores malignos humanos. A proteína supressora de tumor pRb exerce controle chave em certas funções celulares como proliferação, diferenciação e sobrevivência (FURUKAMA *et al.*, 1991; HOROWITZ *et al.*, 1995)

Chellapan *et al.* (1991) e Kaelin *et al.* (1992), apud Grinstein 2006, a inativação ou mutação da pRb resulta em liberação e, conseqüentemente, em um aumento funcional relevante das atividades transativacionais do E2F, o que resulta em contínua progressão do ciclo. Este fato ocorre também quando oncoproteínas virais se ligam ao pRb, liberando fatores indutores de proliferação celular. Estudos indicam a que a E7 do HPV-16 (de alto risco) induz a degradação da pRb por uma via de ubiquitina (BOYER *et al.*, 1996).

A introdução da pRb em células tumorais induz a parada de proliferação celular *in vitro*, sugerindo que a pRb age em células normais regulando o crescimento celular e, caso a proteína esteja ausente ou as funções celulares forem suprimidas por mutação, a célula continua a divisão celular de forma descontrolada (KUMAR, FAUSTO e ABBAS, 2005; UZVOLGYI, CLASSON, HENRIKSSON, 1991; HUANG, *et al.*, 1988). Além do papel chave da pRb no controle do ciclo celular, estudos recentes sugerem que a pRb também exerce funções protetoras contra apoptose. Por exemplo, camundongos *knockout* de pRb morrem durante gestação pelo excesso de indução de apoptose em certos tecidos (LEE *et al.*, 1992; HAAS-KOGAN *et al.*, 1995; BERRY *et al.*, 1996). Estudos indicam que ausência da pRb induz a célula a apoptose e que tecidos em diferenciação apresentam uma elevada expressão celular desta proteína, sugerindo seu papel protetor contra apoptose durante esse processo. Estudos recentes com ratos deficientes em pRb mostraram uma apoptose extensa e uma ausência de diferenciação celular (HICKMAN, MORONI e HELIN, 2002)

Segundo Papadimitrakopoulou, Izzo e Lippman (1997), o papel da pRb no processo carcinogênico também está relacionado com a mutação do cromossomo 9p21-22, presente em dois terços dos cânceres de cabeça e pescoço, que produz uma p16 inativa. Mutações ou deleções neste cromossomo são encontradas em 10% a 33% dos carcinomas espinocelular de cabeça e pescoço, respectivamente. A p16 inibe as quinases dependente de ciclina, que fosforilam a pRb.

Dentre os fatores biológicos com potencial carcinogênico, o Papiloma Vírus Humano (HPV), tem sido objeto de estudo, pois é freqüentemente detectado nos carcinomas de cavidade oral e de orofaringe, sendo também universalmente aceito

como agente causal do câncer de colo de útero (XAVIER, BUSSOLOTI FILHO e LANCELOTTI, 2005; zur HAUSEN, 1996).

2.3 Papilomas e lesões orais induzidas pelo HPV

O Papilomavírus Humano é um pequeno vírus de DNA de fita dupla circular, não-envelopado, icosaédrico, contendo 72 capsômeros, epiteliotrópico, com cerca de 8000 pares de bases com estrutura física e organizacional bem conhecida, da família *Papovaviridae*. Os HPVs induzem lesões hiperproliferativas do epitélio cutâneo e mucosa (zur HAUSEN, 1996; BOUDA *et al.*, 2000; ROSENBLATT, 2005).

Devido à sua importância médica, o HPV tem sido extensivamente estudado, estando associado a uma variedade de patologias, sendo capaz de causar lesões em mucosas urogenitais e bucorespiratórias. A associação entre lesões malignas e infecção pelo HPV no epitélio genital masculino e feminino já é conhecida, sendo considerado como agente causal inequívoco do câncer de colo uterino (XAVIER, BUSSOLOTI FILHO e LANCELOTTI, 2005; SYRJANEN *et al.*, 1983). Na cavidade oral, esses vírus estão associados ao desenvolvimento de lesões como a verruga vulgar, o papiloma, o condiloma acuminado e a hiperplasia epitelial focal e seu interesse cresceu enormemente a partir do momento em que foram associados a lesões malignas orais, especialmente ao carcinoma oral de células escamosas (SHIMA *et al* 2000; CHANG, 1991; REGEZI e SCIUBBA, 1993).

O termo Papiloma é uma denominação genérica usada para incluir crescimentos papilares verrucosos benignos, formados por epitélio e pequenas quantidades de tecido conjuntivo de sustentação. A etiologia é, na maioria dos casos, desconhecida, sendo alguns de origem virótica associada ao HPV. Além disso, pode estar associado a traumatismo crônico de baixa intensidade. (TOMMASI, 2002; SHAFER, HINE e LEVY, 1987; REGEZI e SCIUBBA, 1993; BORAKS, 1996). Clinicamente apresenta-se com crescimento exofítico geralmente pediculado, cuja superfície mostra projeções digitiformes ou verrucóides, que se assemelham a couve-flor. Histologicamente, a característica essencial é a proliferação de células espinhosas em padrão papilar, além de exibirem coilocitose (SHAFER, HINE e LEVY, 1987; TOMMASI, 2002).

Os papilomas, apesar de serem considerados tumores benignos, e terem na maioria dos casos um prognóstico bom, fazem parte das lesões com potencial de malignização, principalmente nos casos de etiologia viral pelo HPV, sobretudo quando recidivados ou quando ulcerados, independente do tamanho, volume, localização ou idade (ZEGARELLI, 1982; LITTLE, 1988). Estudos sugerem que a presença concomitante do HPV em lesões benignas e alteração na p53 sejam fatores promotores dessa transformação (BARZAL-NOWOSIELSKA, MIASKO e CHYCZEWSKI, 2004).

Atualmente são conhecidos mais de 100 tipos de HPV, dos quais 24 foram associados a lesões orais (HPV-1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 45, 52, 55, 57, 59, 69, 72 e 73, 01,40,44,72,07). Quatro tipos de HPV são particularmente importantes, os tipos 06, 11, 16 e 18. Os dois primeiros, classificados como de baixo potencial para malignidade, estão associados a lesões

benignas da cavidade oral, como os papilomas. Já o HPV-16 e o HPV-18, de alto potencial de malignidade, são comprovadamente carcinogênicos e estão associados à produção das oncoproteínas E6 e E7 produzidas pelos mesmos (TERAI e BURK, 2001; TERAJ *et al*, 2001; SNIJDERS *et al.*, 1997; MILLER *et al.*, 1996).

O genoma do Papilomavírus é constituído por dois segmentos principais, sendo cada um constituído por uma série de regiões ou *opening reading frame* (ORFs), que codificam as proteínas virais. Este genoma pode ser dividido em três regiões; as regiões precoces “*early*” (E: E1 - E7), e tardias “*later*” (L: L1 e L2), responsáveis pelos processos iniciais e finais de replicação, respectivamente, e a região LCR (região longa de controle), que compreende 10% do seu genoma (zur HAUSEN, 1996; KIRNBAUER *et al.*, 1993).

As regiões E são expressas logo no início da infecção, sendo responsáveis pelos mecanismos de regulação da síntese de DNA. Essas regiões E são expressas em células infectadas, além de células transformadas. Já as regiões L expressas nos estágios posteriores da infecção codificam as proteínas do capsídeo viral. As proteínas L1 e L2 são utilizadas na adesão celular entre o vírus e as diversas células teciduais (zur HAUSEN, 1996). A LCR, ou região não codante, varia de tamanho entre os papilomavírus, sendo esta região responsável pelo controle da expressão genética e processos como transcrição e replicação viral (zur HAUSEN, 1996, ROSENBLATT, 2005) (Figura 3).

O HPV é um vírus que se multiplica exclusivamente no núcleo de células infectadas (SARRUF e DIAS, 1997; TERAJ, *et al* 2001). A infecção pelo HPV é iniciada quando uma partícula viral penetra em células basais e em células indiferenciadas e em divisão do epitélio. Os receptores pelos quais os papilomavirus

se ligam e entram na célula ainda não foram completamente identificados. Estudos recentes indicam que a expressão da integrina $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$, presentes na superfície de células basais seriam candidatos a receptores do vírus do papiloma. O genoma do HPV, nas células basais e parabasais se estabelece como epissoma, replicando-se, como acontece nas lesões benignas e pré-invasivas em baixo padrão (DOORBAR, 2005; ROSENBLATT *et al.*, 2005) e apenas genes envolvidos nos processos iniciais da infecção são transcritos, como o E5, E6 e E7. Multiplicação extensiva do DNA viral e transcrição de todos os genes, bem como a formação do capsídeo viral (L1 e L2) ocorre apenas nas camadas suprabasais. Partículas virais maduras estão, portanto, ausentes nas células basais, e a replicação produtiva do DNA está restrita às células do estrato espinhoso e granuloso (CHANG, 1991).

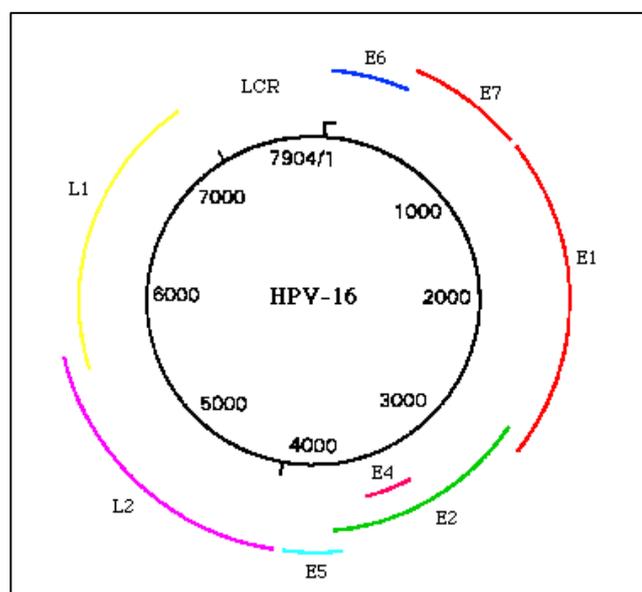


Figura 3: Genoma do HPV-16. GUTIERREZ e GARZA, 2001

As lesões causadas pelo HPV dependem do tipo do vírus, além da região da camada epitelial em que ele permanece. Os HPV de baixo risco, geralmente replicam-se só nas camadas inferiores do epitélio estratificado, enquanto os ceratinócitos estão passando por divisão celular. Em contraste, os HPVs de alto risco tem o genoma integrado ao DNA e se replicam nas camadas mais altas do epitélio, quando os ceratinócitos entram completamente no processo de diferenciação terminal. Desta forma, os tipos virais de alto risco podem estimular as células a replicar o DNA em meios não-habituais em maiores proporções do que os tipos de baixo risco (THOMAS, PIM, BANK, 1999; ROSENBLATT *et al.*, 2005).

As proteínas E6 e E7 são as principais responsáveis pela transformação celular mediada pelos HPVs de alto risco que atuam na modulação de atividades de proteínas celulares que regulam o ciclo celular (ROSENBLATT *et al.*, 2005; SYRJÄNEN e SYRJÄNEN, 1999; SOUTHERN e HERRINGTON, 2000). O gene L1 regula os níveis de expressão das proteínas virais E6 e E7, importantes na tumorigênese, devido a interação e inativação das funções supressoras das proteínas p53 e pRb (zur HAUSEN, 1996)

A propriedade de imortalização não se verifica nas infecções causadas pelos HPVs de baixo risco. Os genes E6 e E7 dos HPVs de alto risco são juntos necessários e suficientes para imortalização de células epiteliais escamosas primárias, enquanto que as E6 e E7 codificadas pelos HPVs de baixo risco estão ou inativas ou fracamente ativadas na mesma amostra . Os genes E6 e E7 estão invariavelmente expressos em lesões malignas cervicais HPV positivas (FRANCIS, SCHMID e HOWLEY 2000).

O E6 é um dos principais genes expressos na infecção pelo HPV e este possui um papel importante na imortalização celular. A atividade transformadora da oncoproteína E6 é dependente da sua ligação com a proteína supressora de tumor p53. A E6 liga-se, seqüestra e degrada fisiologicamente a p53 por uma via ubiquitina-dependente. A associação de E6 com a p53 é mediada por uma proteína celular adicional, chamada proteína associada a E6 (E6-AP). Em estudos *in vitro*, esta proteína purificada se associa a p53 estimulando a ligação de E6 com a p53 e induzindo a degradação desta última por ação dependente da primeira (SUGERMAN e SHILLITOE, 1997; CROOK e VOUSDEN, 1994). Esse fenômeno interfere de maneira relevante nos mecanismos de apoptose e reparo de DNA (RAPP e CHEM, 1998).

A formação do complexo E6-p53 é fundamental para a inativação das funções supressoras da p53. Essa parece ser uma atividade específica dos HPVs de alto risco, pois os HPVs de baixo risco codificam E6 que não inativam a p53 pelo mesmo mecanismo (WERNESSE, LEVINE e HOWLEY, 1990).

Por outro lado a E7 se liga e seqüestra a pRb, induzindo a sua degradação, fato observado devido à redução da meia-vida desta proteína em células expressando HPVs de alto risco. A E7 ligada a pRb, preferencialmente na forma ativa, facilita a liberação de E2F, promovendo, desta forma, a progressão do ciclo celular, atuando nas fases G1 e S, o que pode eventualmente propiciar o desenvolvimento do câncer (BOYER *et al.*, 1996).

A E7 também pode estar associada a outras proteínas envolvidas na proliferação celular, como as histonas diacetilases, componentes do complexo de transcrição AP-1 e inibidores de ciclina dependente de quinase p21^{wap1/cip1}, p27^{kip1}

(JONES, ALANI e MUNGER, 1997; ZERFASS-THOME *et al.*, 1996; ROSENBLATT *et al.*, 2005). A E7 dos HPV de baixo risco ligam-se ao pRb com baixa afinidade enquanto aquelas dos HPV de alto risco se ligam com alta afinidade com várias proteínas celulares do hospedeiro (LEE, RUSSO e PAVLETICH, 1998).

A detecção direta dos genomas do HPV e seus transcritos pode ser conseguida com procedimentos que incluem imunoperoxidase, hibridizações *Southern Blot*, *Nothern Blot*, *dot blot*, captura híbrida, PCR, dentre outros (MILLER e WHITE, 1996).

A sensibilidade e especificidade dos vários métodos de detecção do HPV disponíveis variam amplamente. A PCR pode ser considerada a técnica apropriada, onde pequenos segmentos de DNA são geralmente esperados, sendo considerado um método de grande sensibilidade (YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Analisar a expressão imuno-histoquímica (imunoeexpressão) das proteínas p53 e pRb em carcinomas escamocelulares, papilomas e tecidos histologicamente normais da cavidade oral e associar os achados à presença do HPV.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar o escore de imunoeexpressão das proteínas p53 e pRb em carcinomas, papilomas e tecidos histologicamente normais da cavidade oral;
- Relacionar o escore da imunoeexpressão das proteínas p53 e pRb com a natureza das lesões (malignas ou benignas);
- Relacionar o grau de diferenciação das lesões de carcinomas com o escore da imunoeexpressão das proteínas p53 e pRb;
- Correlacionar a imunoeexpressão das proteínas p53 e pRb com a detecção do HPV pelo método de PCR.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção da amostra

Foram selecionadas 56 biópsias em blocos parafinados da cavidade oral, 31 com diagnóstico confirmado de carcinomas escamocelular, 19 de papilomas e 6 amostras de tecido histologicamente normal, obtidas entre julho de 2002 e julho de 2005 dos laudos do Laboratório de anatomia patológica Silvano- Studart do Hospital Português, para realização das técnicas de imuno-histoquímica e PCR. Das 31 amostras com diagnóstico de carcinoma escamocelular, 6 (10,7%) eram pouco diferenciados, 18 (58%) eram moderadamente diferenciados e 7 (22,6%) bem diferenciados (tabela 1). O controle positivo para p53 foi feito com tecido extraído de neoplasia maligna de mama, enquanto para a pRb o controle positivo foi feito com tecido extraído de amígdalas.

4.2 Aspectos Éticos

O projeto da dissertação foi analisado e aprovado pelos membros do Comitê de Ética em Pesquisa Hospital Aristides Maltez em reunião de 25 de julho de 2005, sendo registrado sob o nº. 85/05.

4.3 Imuno-histoquímica para detecção de p53 e pRb

4.3.1 Preparo das lâminas e desparafinização

Os blocos de parafina selecionados contendo as biópsias foram submetidos a cortes de 5 μ m em micrótomo e fixados em lâminas de vidro.

Para realização da imuno-histoquímica os cortes fixados nas lâminas foram previamente desparafinadas através de banhos com solventes apropriados. Foram realizadas duas imersões das lâminas em Xilol absoluto por 5 minutos cada, em recipientes diferentes, e posteriormente foi feita imersão em álcool absoluto, por 3 minutos, seguida das imersões com álcool 70%, 50% e 30%, por 1 minuto cada, nesta seqüência, e por último três lavagens com água destilada corrente para hidratação dos cortes.

4.3.2 Recuperação antigênica

A técnica de recuperação antigênica (RA), predominantemente baseada no aquecimento dos tecidos a altas temperaturas, é utilizada como um pré-tratamento não enzimático para a imuno-histoquímica em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina. A fixação em formol promove, no tecido, ligações múltiplas entre os grupos aminos e a formação de pontes de metileno entre os vários aminoácidos presentes nos peptídeos de uma determinada proteína e desta com a proteína adjacente. Estas múltiplas ligações bloqueiam o acesso dos anticorpos aos epítomos alvo, mascarando os antígenos. Esta técnica expõe os epítomos, antes mascarados,

utilizando o Tampão Citrato, pH 6.0, por 40min em Banho Maria a 97°C, após o qual é resfriado por 20min a temperatura ambiente (T/A).

Após a RA realiza-se três lavagens com água corrente e três lavagens com água destilada.

4.3.3 Bloqueio da peroxidase endógena

A peroxidase endógena, enzima presente nos tecidos, reage com o diaminobenzidina (DAB), o que compromete a revelação da técnica de imunohistoquímica e deve ser, portanto, inativada ou bloqueada. Para o Bloqueio desta enzima, as lâminas foram imersas em solução de Metanol e Peróxido de Hidrogênio a 3% por 20min a T/A. Posteriormente foram realizadas três lavagens em água corrente, seguida por duas lavagens com solução de PBS durante 5 min.

4.3.4 Detecção das Proteínas p53 e pRb

Os preparos histológicos tratados, como descritos anteriormente, foram utilizados para detecção das proteínas p53 e pRb.

As lâminas foram colocadas na câmara úmida e os cortes fixados foram demarcados com a caneta Dako, determinando a região de ação do anticorpo primário. Os anticorpos primários foram previamente diluídos (diluyente DAKO), em uma concentração de 1:400 tanto os Anti-human p53 protein (DAKO Clone D-07), como o Anti-human pRb (DAKO Clone Rb1), de acordo com as recomendações do fabricante.

Os cortes foram incubados overnight a 4° C com anticorpos primários: Anti-human p53 protein e Anti-human pRb protein e, então retiradas da geladeira e colocadas durante 30 minutos a temperatura ambiente (T/A). Os cortes foram então lavados por duas vezes durante 5 min com PBS e incubados com Anticorpos Secundários (anti-IgG camundongo) durante 20 min a T/A e posteriormente lavados duas vezes com PBS por 5 minutos.

4.3.5. Revelação da reação

O revelado da reação foi realizado com o kit Streptoavidina (DAKO) por 30 min T/A. As secções teciduais foram lavadas três vezes com PBS, por 5 minutos. Após esse período foi gotejado sobre os cortes solução contendo 1 gota de DAB para 1mL de substrato durante 1 minuto. Os cortes foram lavados em água corrente e em seguida contra-corado em imersão com solução de Hematoxilina de Harris por 1min. As secções foram lavadas em água corrente e posteriormente desidratadas através imersões em solventes: 3 vezes em álcool absoluto por 2 minutos, seguida por 2 banhos em solução xilol por 2 minutos cada. As lâminas foram montadas com bálsamo e lamínula.

4.3.6. Leitura da Expressão das proteínas p53 e pRb

A leitura das lâminas de imuno-histoquímica para p53 e pRb, montadas como mencionadas anteriormente, foi feita em microscópio ótico em lentes de 40X, considerando positivas as células com coloração especificamente nuclear. Em cada lâmina foi observada a quantidade de células coradas e classificadas como: score 0

(imunexpressão inferior a 10%, sendo 10% o *cut-off* estabelecido no estudo), considerado negativo para imunexpressão; escore 1 (imunexpressão entre 10% a 50%), escore 2 (imunexpressão acima de 50%).

Tabela 1. Perfil das amostras selecionadas

<i>Variáveis</i>	<i>n = 56</i>	<i>%</i>
Diagnóstico histopatológico		
Epitélio histologicamente normal	6	10,7
Papiloma	19	33,9
Carcinoma	31	55,4
Grau de diferenciação do Carcinoma		
Pouco diferenciado	6	19,4
Moderadamente diferenciado	18	58,0
Bem diferenciado	7	22,6

n = número de população de estudo

4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.4.1 Desparafinização dos cortes

Antes da realização do PCR propriamente dito as amostras foram submetidas à desparafinização através de banhos sucessivos com soluções solventes.

Para cada amostra foram obtidos 3 cortes de 5 μ m. Estes cortes foram colocados em tubos do tipo Eppendorf. As amostras foram submetidas a 3 banhos de Xilol durante 30 minutos em banho maria à uma temperatura de 65 °C e após

cada banho foi centrifugado a 12000rpm por 7 minutos, descartando-se o sobrenadante. Os cortes então foram submetidos a sucessivos banhos com álcool em concentrações diferentes, álcool absoluto, 95%, 70%, 50% e 30%, centrifugando-se posteriormente a 12000 rpm por 5 minutos. Após os banhos com solventes, as amostras foram submetidas a 2 banhos com água Milli-Q centrifugando-se rapidamente no primeiro banho e por 12000 rpm durante 7 minutos no último banho.

4.4.2 Extração do DNA

Para a extração de DNA foi realizado o kit Qiamp da Qiagen. Foram adicionados às amostras 180 μ L de Buffer ATL e 20 μ L de proteinase K. Os tubos foram agitados no vórtex e posteriormente incubados em banho maria a 56°C por 72 horas. Após esse tempo as amostras foram centrifugadas. Em seguida foram adicionados 200 μ L de buffer AL, colocado no vórtex durante 15 segundos e incubados a 70°C por 10 minutos. Foram adicionados 200 μ L de etanol (100%), e as amostras foram agitadas no vórtex e centrifugadas rapidamente. As amostras foram colocadas, juntamente com o precipitado, na coluna (*cillum*) sem molhar a borda e centrifugadas a 8000 rpm por 1 minuto. A coluna Qiamp Spin foi colocada em um tubo limpo de 2 mL. Foi adicionado 500 μ L de buffer AW1. As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm por 1 minuto. A coluna Qiamp Spin foi colocada em um tubo limpo. Foi adicionado 500 μ L de Buffer AW2 e as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos. A coluna Qiamp Spin foi colocada em um tubo do tipo eppendorf e foi adicionada 200 μ L de buffer AL foram centrifugadas a 8000 rpm por 1 minuto.

4.4.3 Amplificação do DNA viral

A PCR foi realizada para a amplificação do DNA-HPV, utilizando os *primers* MY09-MY11 (Invitrogen) (Tabela 2), correspondentes a região L1 do genoma viral (BAUER & MANOS, 1993 e KANESHIMA *et al.*, 2001). Estes iniciadores se unem a uma região de 450 pares de bases (pb) do gene L1 altamente conservado nos diferentes tipos de HPV.

As reações de amplificação para os *primers* foram realizadas em um termociclador Gene Amp OCR System 2400 (Perkin Elmer). O DNA genômico (20 μ L) foi adicionado a mistura contendo: 4.0mM de MgCl₂; 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP); 5 μ L de Tampão 10X; 50pmol de cada *primer* (MY09 e MY11); 2.5U de Taq DNA polimerase e H₂O Mili-Q para um volume final da reação de 50 μ L . A reação foi realizada nas seguintes condições: o primeiro ciclo da amplificação consistiu de 5 minutos a 95°C e 35 ciclos de 92°C por 40 minutos (Desnaturação), 56°C por 50 minutos (Anelacão) e 72°C por 1minuto (Extensão). A etapa final de extensão foi de 72°C por 4 minutos.

Tabela 2. Seqüência de nucleotídeos e *primers*

<i>Primer</i>	<i>Seqüência (5' – 3')^a</i>
MY9 <i>downstream</i> HPV L1	CGTCCMAARGGAWACTGATC
MY11 <i>upstream</i> HPV L1	GCMCAGGGWCATAAYAATGG
PCO4 <i>downstream</i> β -globina	CAACTTCATCCACGTTCCACC
GH20 <i>upstream</i> β -globina	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

M= A OU C, R= A OU G, W= A OU T, Y= C OU T

4.4.4 Leitura do PCR

Após a realização do PCR os produtos da reação foram submetidos à corrida eletroforética em cuba horizontal a 110V durante 45 minutos em 2% de gel de agarose. O gel foi corado com brometo de etídio, e os fragmentos de DNA foram visualizados através de um transiluminador com luz Ultra-violeta.

4.5 Análise estatística

Os dados encontrados foram submetidos à análise estatística com o auxílio do Software SPSS (Statistical Package for Social Science), versão 9.0 para Windows. Foi aplicado um nível de significância de 5%, assim os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi aplicado para comparar as variáveis e como teste de comparação múltipla foi aplicado o Dunnett T3.

5. RESULTADOS

5.1 Resultados da Imuno-histoquímica

A marcação das proteínas p53 e pRb foi nuclear e homogênea (figuras 4, 5, 6, 7 e 8). Das 31 amostras de carcinoma escamocelular analisadas, 12 (38,7%) foram consideradas negativas de acordo com o *cut off* estabelecido para imunoexpressão da p53 e 19 (61,3%) foram consideradas positivas, sendo que 4 (12,9%) apresentaram escore 1 e 15 (48,4%) apresentaram escore 2. Enquanto nos papilomas escamosos de um total de 19 amostras, 18 (94,7%) foram consideradas negativas, portanto escore 0, e em 1 amostra (5,3%) houve uma imunoexpressão de p53 acima do *cut off* estabelecido, sendo o escore desta 1. Das 6 amostras de tecidos histologicamente normais, em 3 (50%) não houve imunoexpressão da p53, enquanto em 3 (50%) houve detecção da proteína em escore 1. Em relação à pRb, 12 amostras de carcinoma (38,7%) apresentaram uma imunoexpressão abaixo do *cut off*, portanto escore 0, enquanto 19 amostras (61,3%), apresentaram resultado positivo, sendo que 10 (32,3%) apresentaram escore 1 enquanto 9 (29%) apresentaram escore 2. Nas amostras de lesões papilomatosas 14 (73,7%) apresentaram imunoexpressão abaixo do *cut off*, e 5 (26,3%) foram consideradas positivas quanto a detecção protéica, sendo 1 o escore destas. Das amostras de tecido normal, 5 (83,3%) não apresentaram detecção para pRb, enquanto 1 amostra (16,7%) apresentou escore 1 (tabelas 3,4,5 e 6) (figuras 9,10,11 e 12).

A comparação dos resultados entre os três grupos (epitélio histologicamente normal, papiloma e carcinoma) de acordo com os escores (0,1 e 2) para a p53, aplicando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o teste de comparação múltipla de Dunnett T3, mostrou que existiu uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,000$) entre os *ranks* médios das lesões papilomatosas e carcinomas. E de acordo com a pRb, houve diferença estatística entre os *ranks* médios do epitélio histologicamente normal e carcinoma ($p=0,014$) e papilomas e carcinomas ($p=0,003$).

De acordo com o grau de diferenciação do carcinoma e a imunopressão da p53, das 31 amostras 6 eram pouco diferenciadas, tendo 3(50%) dessas imunopressão escore 1, e 3 (50%) escore 2. Nenhum dos carcinomas pouco diferenciados apresentou escore 0. Das 18 amostras de carcinomas moderadamente diferenciados, 9 (50%) não expressaram a p53 de acordo com o *cut-off* estabelecido. Nenhum desses carcinomas apresentou escore 1 e 9 (50%) apresentaram escore 2. 42,9% dos 7 carcinomas bem diferenciados não apresentaram imunopressão, enquanto que 14,2% apresentaram escore 1 e 42,9% apresentaram escore 2 (tabela 7)(figura 13).

De acordo com a imunopressão da pRb e o grau de diferenciação, dos 6 carcinomas pouco diferenciados 2 (33,3%) não expressaram a proteína, enquanto 2 (33,3%) tiveram escore de imunopressão 1 e 33,3% escore 2. Dos carcinomas moderadamente diferenciados, 50% não expressaram a pRb, enquanto 33,3% expressaram escore 1 e 16,7% escore 2. Dos carcinomas bem diferenciados 1(14,3%) não apresentou imunopressão, 2 (28,6%) apresentaram escore 1 e 4 (57,1%) escore 2 (tabela 8) (figura 14).

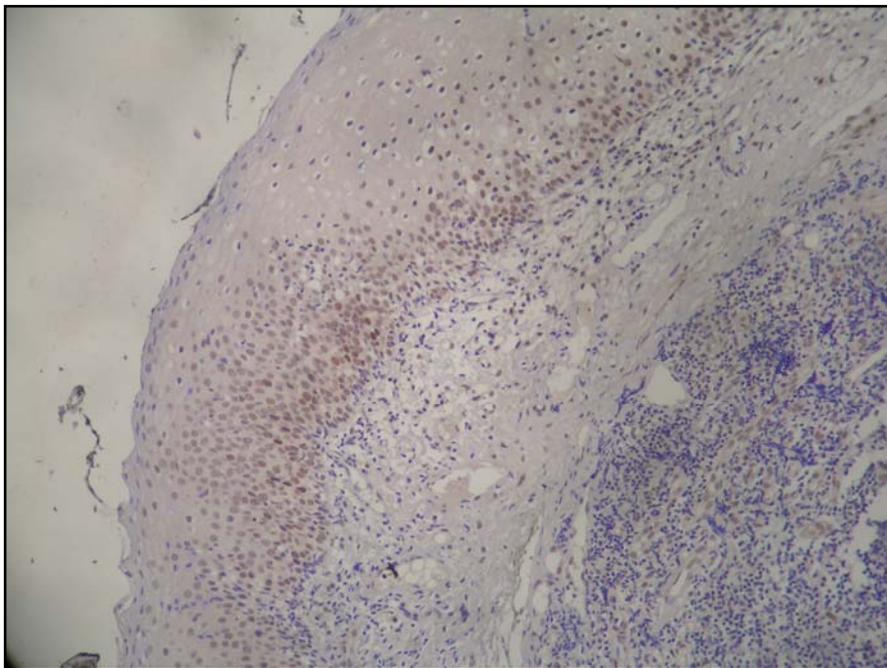


Figura 4: Imunoexpressão da p53 escore 1 em tecido histologicamente normal 10x (caso 09);

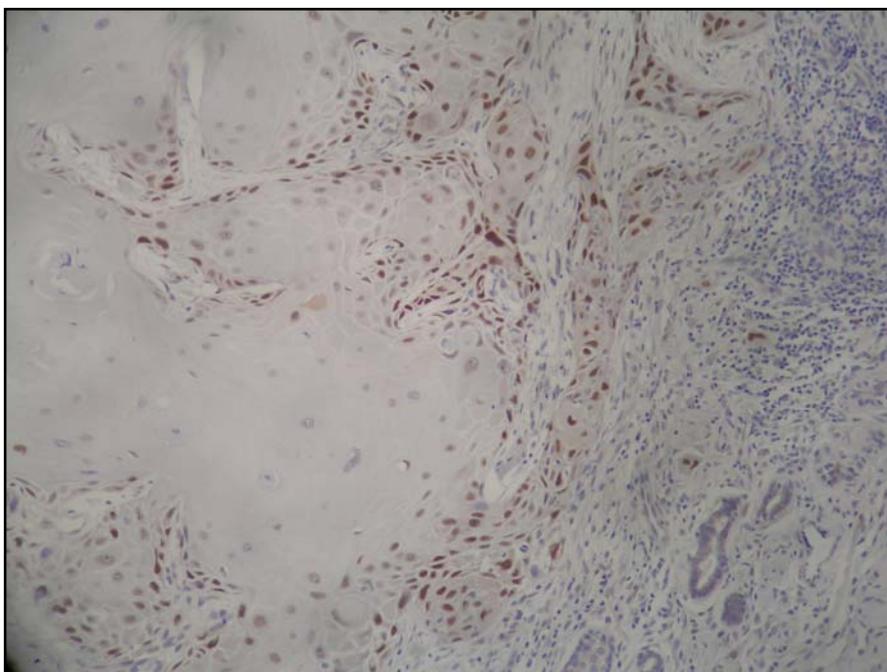


Figura 5: Imunoexpressão da p53 escore 1 em carcinoma bem diferenciado 10 x (caso 31);

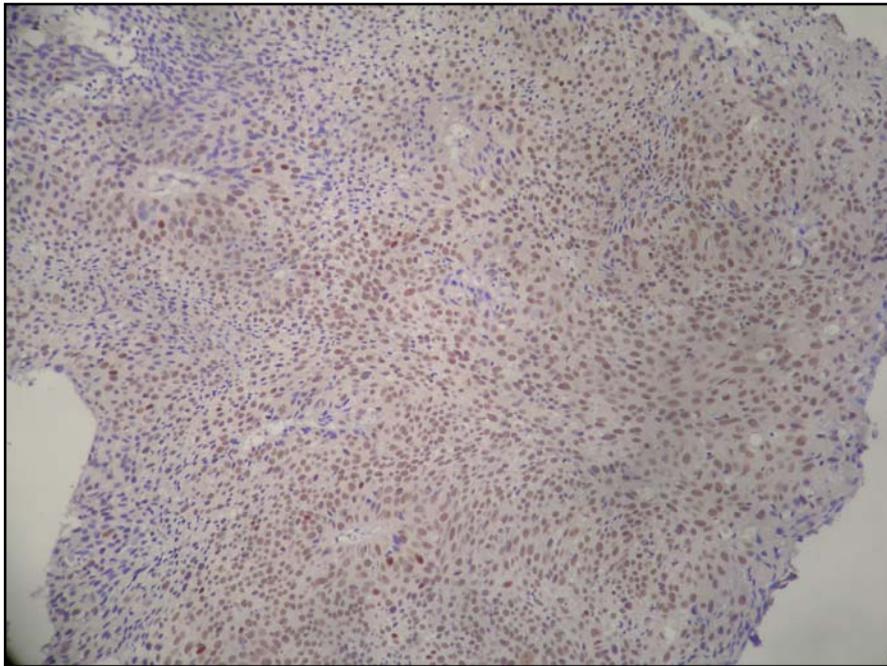


Figura 6: Imunoexpressão da p53 escore 2 em carcinoma pouco diferenciado 20x (caso 11).

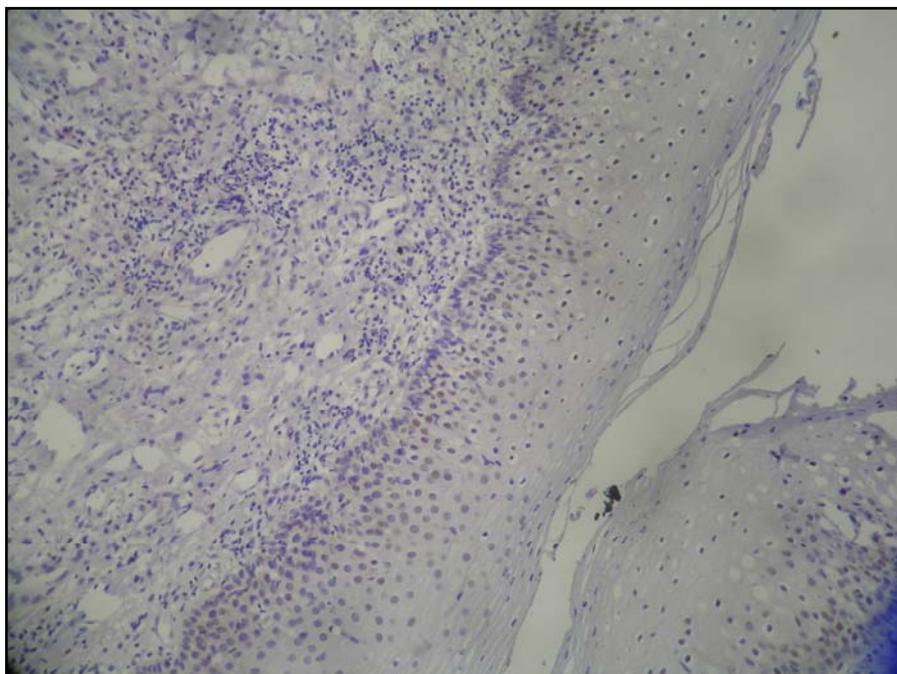


Figura 7: Imunoexpressão da pRb escore 1 em tecido histologicamente normal 10x (caso 09);

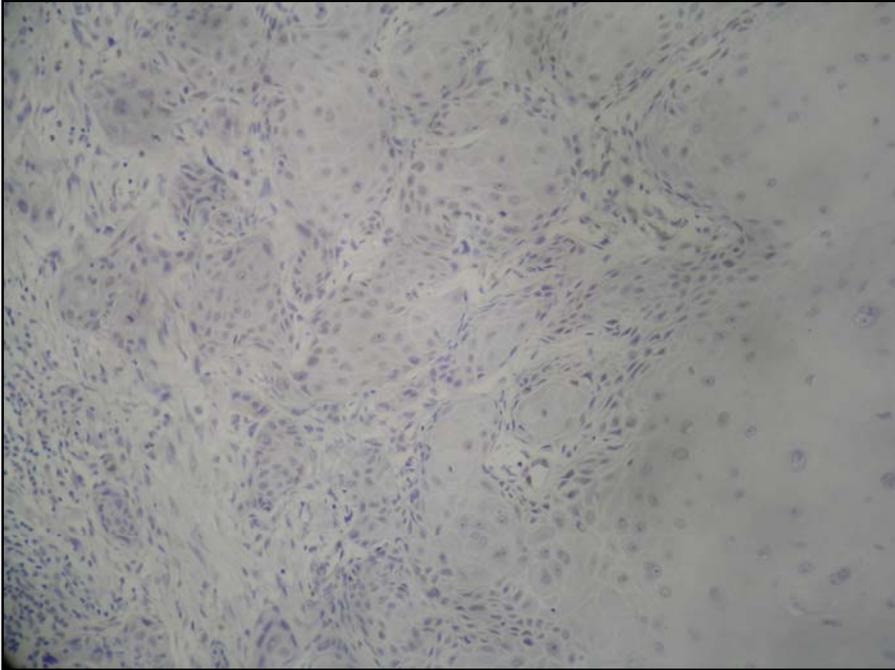


Figura 8: Imunoexpressão da pRb score 1 em carcinoma bem diferenciado 10 x (caso 31);

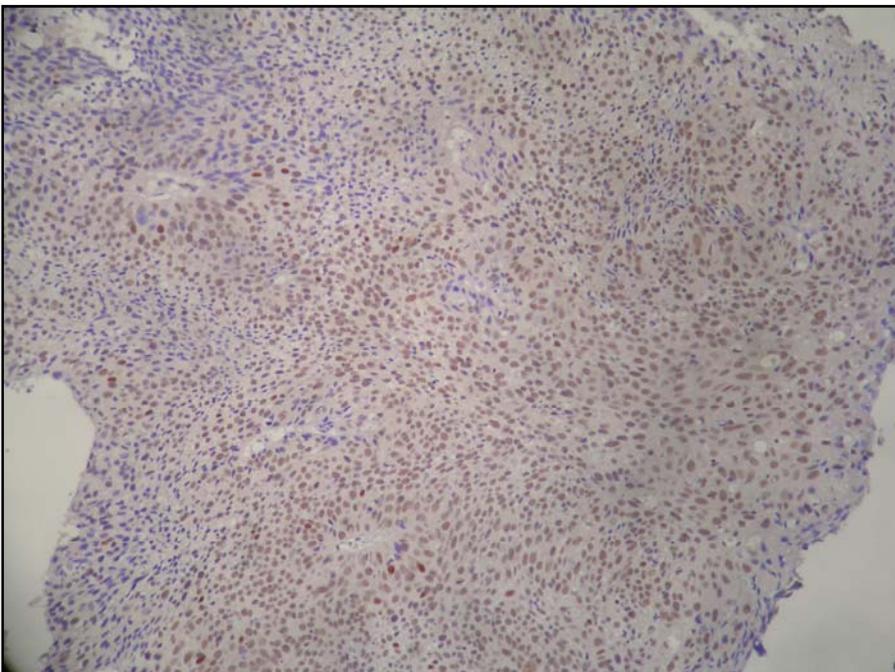


Figura 9: Imunoexpressão da pRb score 2 em carcinoma bem diferenciado 20x (caso 20)

Tabela 3. Frequência da imunoposição da p53 de acordo com o diagnóstico histológico.

Imuno-histoquímica para p53	Diagnóstico histopatológico						Total	
	Epitélio normal		Papiloma		Carcinoma		n = 56	%
	n = 6	%	n = 19	%	n = 31	%		
Negativa	3	50,0	18	94,7	12	38,7	33	58,9
Positiva	3	50,0	1	5,3	19	61,3	8	14,3

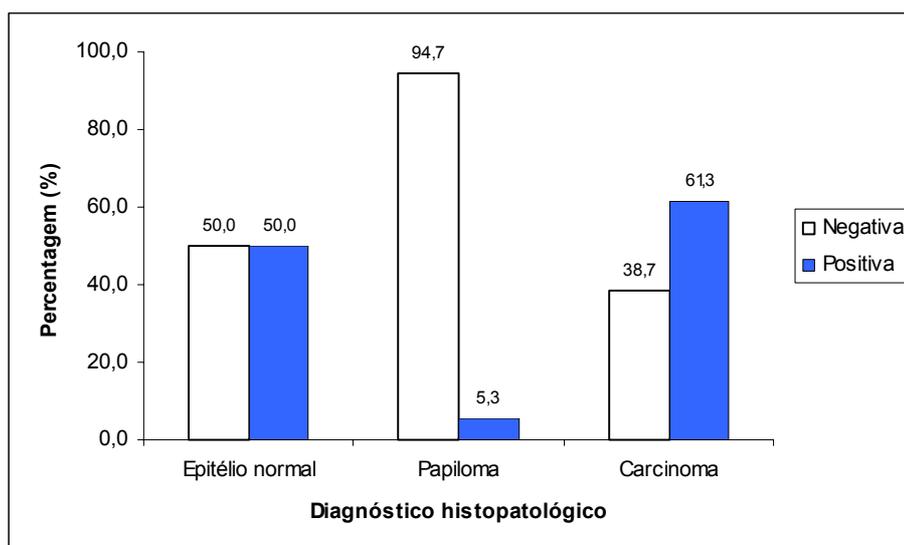


Figura 10: Imunoposição da p53 de acordo com o diagnóstico histopatológico

Tabela 4. Frequência da imunoposição da pRb de acordo com o diagnóstico histológico

Imuno-histoquímica para pRB	Diagnóstico histopatológico						Total	
	Epitélio normal		Papiloma		Carcinoma		n = 56	%
	n = 6	%	n = 19	%	n = 31	%		
Negativa	5	83,3	14	73,7	12	38,7	31	55,3
Positiva	1	16,7	5	26,3	19	61,3	16	28,6

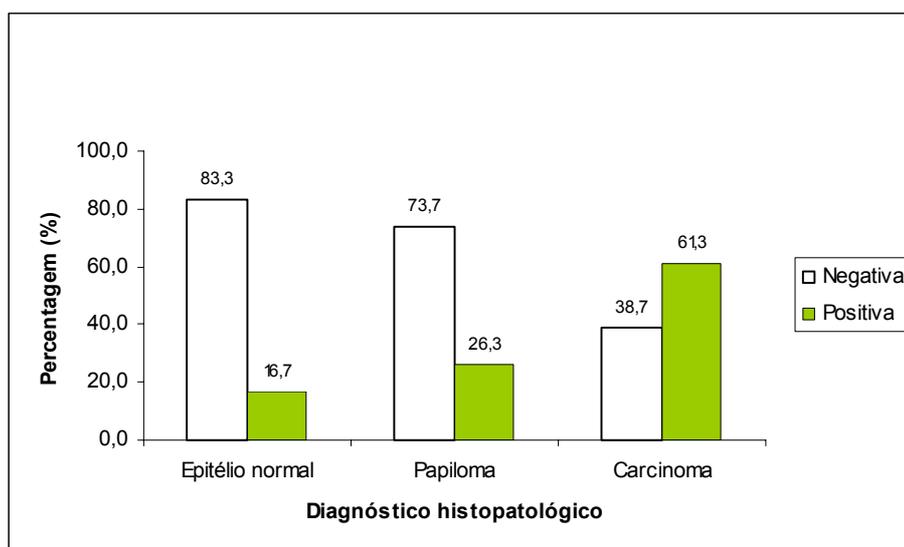


Figura 11: Imunoposição da pRb de acordo com o diagnóstico histopatológico

Tabela 5. Frequência da imunopressão da p53 de acordo com os escores e com o diagnóstico histológico

Imuno-histoquímica para p53	Diagnóstico histopatológico						Total	
	Epitélio normal		Papiloma		Carcinoma		n = 56	%
	n = 6	%	n = 19	%	n = 31	%		
Escore (0) Inferior a 10,0%	3	50,0	18	94,7	12	38,7	33	58,9
Escore (1) Entre 10,0% e 50,0%	3	50,0	1	5,3	4	12,9	8	14,3
Escore (2) Acima de 50%	0	---	0	---	15	48,4	15	26,8

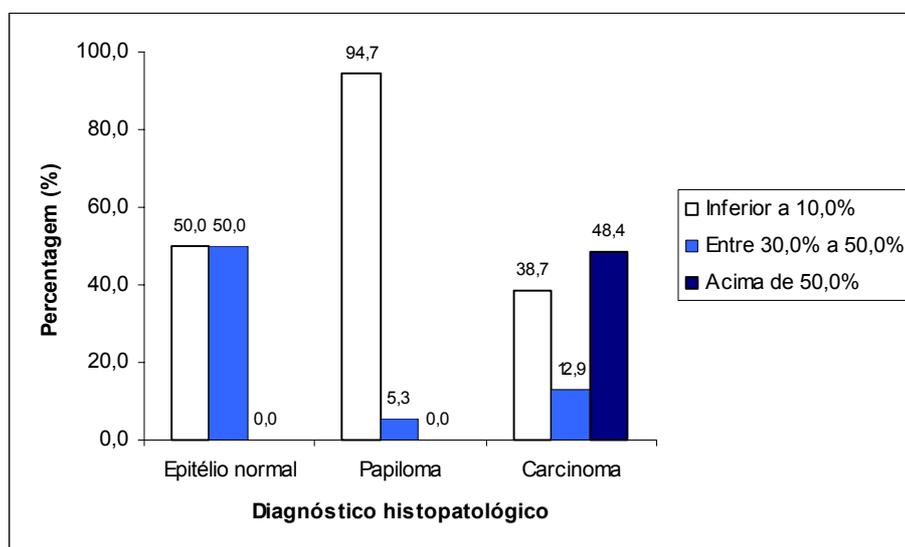


Figura 12: Distribuição da p53 de acordo com o diagnóstico histopatológico

Tabela 6: Frequência da imunoposição da pRb de acordo com os escores e com o diagnóstico Histológico

Imuno-histoquímica para pRB	Diagnóstico histopatológico						Total	
	Epitélio normal		Papiloma		Carcinoma		n = 56	%
	n = 6	%	n = 19	%	n = 31	%		
Escore (0) Inferior a 10,0%	5	83,3	14	73,7	12	38,7	31	55,3
Escore (1) Entre 10,0% e 50,0%	1	16,7	5	26,3	10	32,3	16	28,6
Escore (2) Acima de 50%	0	---	0	---	9	29,0	9	16,1

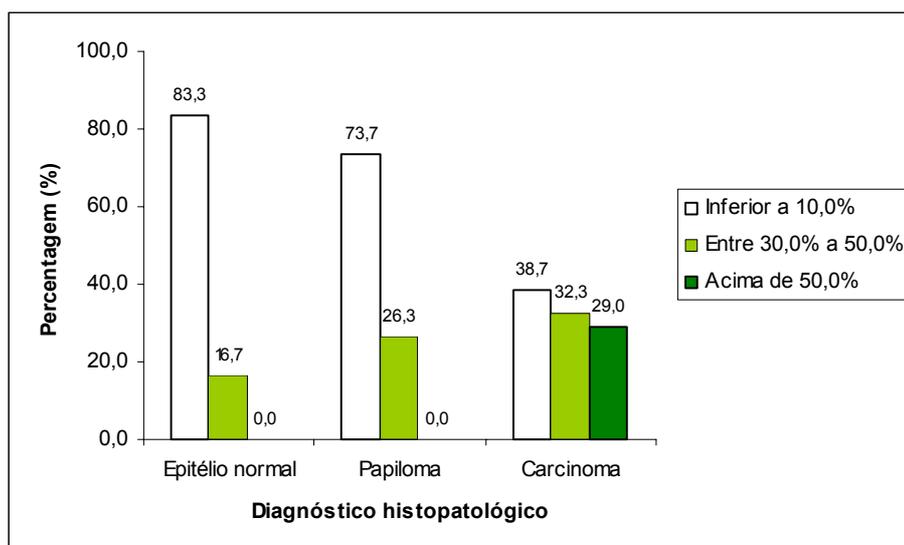


Figura 13: Distribuição da pRb de acordo com o diagnóstico histopatológico

Tabela 7: Freqüência da imunoposição da p53 de acordo com o grau de diferenciação do carcinoma

Imuno-histoquímica para p53	Grau de diferenciação do carcinoma						Total	
	Pouco		Moderadamente		Bem		n = 31	%
	n = 6	%	n = 18	%	n = 7	%		
Escore (0) Inferior a 10,0%	0	---	9	50,0	3	42,9	12	38,7
Escore (1) Entre 10,0% e 50,0%	3	50,0	0	---	1	14,2	4	12,9
Escore (2) Acima de 50%	3	50,0	9	50,0	3	42,9	15	48,4

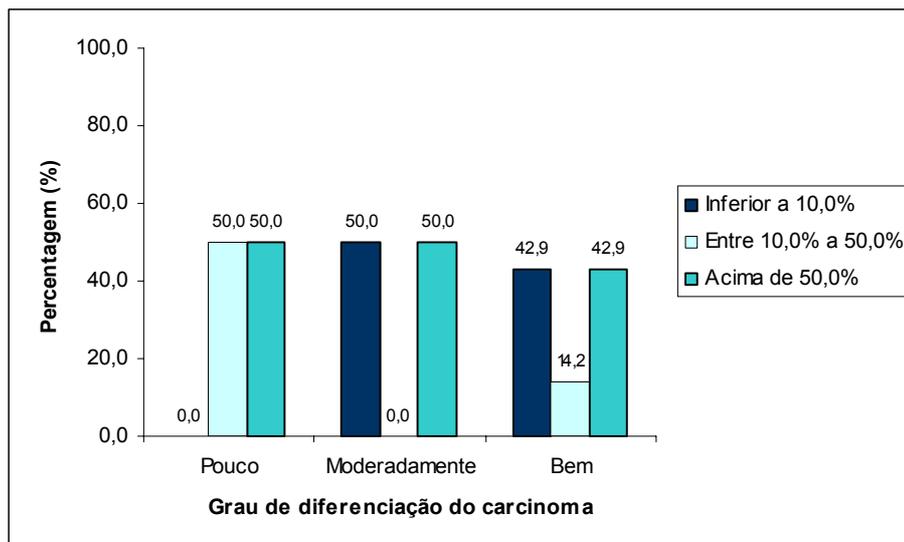


Figura 14: Distribuição da expressão da p53 de acordo com o grau de diferenciação do carcinoma

Tabela 8: Freqüência da imunexpressão da pRb de acordo com o grau de diferenciação do carcinoma

Imuno-histoquímica para pRB	Grau de diferenciação do carcinoma						Total	
	Pouco		Moderadamente		Bem		n = 31	%
	n = 6	%	n = 18	%	n = 7	%		
Escore (0) Inferior a 10,0%	2	33,3	9	50,0	1	14,3	12	38,7
Escore (1) Entre 10,0% e 50,0%	2	33,3	6	33,3	2	28,6	10	32,3
Escore (2) Acima de 50%	2	33,3	3	16,7	4	57,1	9	29,0

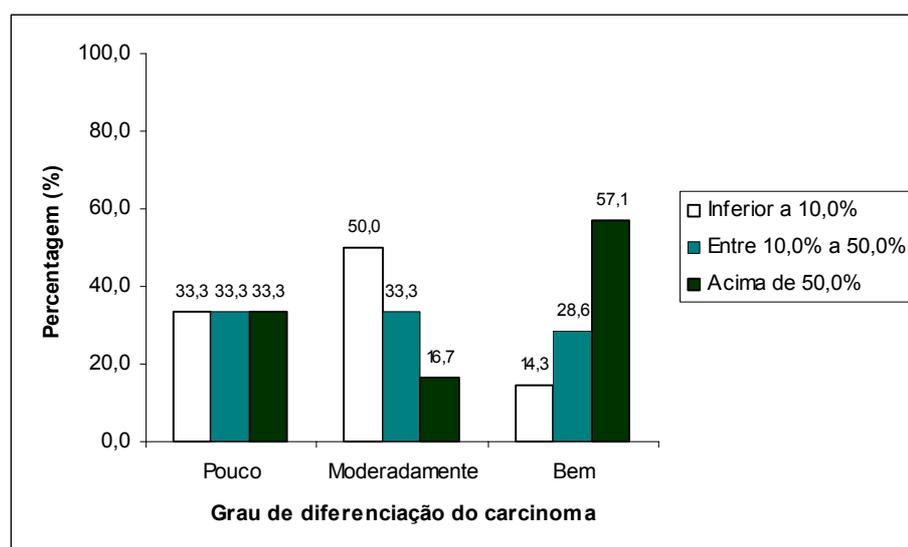


Figura 15: Distribuição da expressão da pRb de acordo com o grau de diferenciação do carcinoma

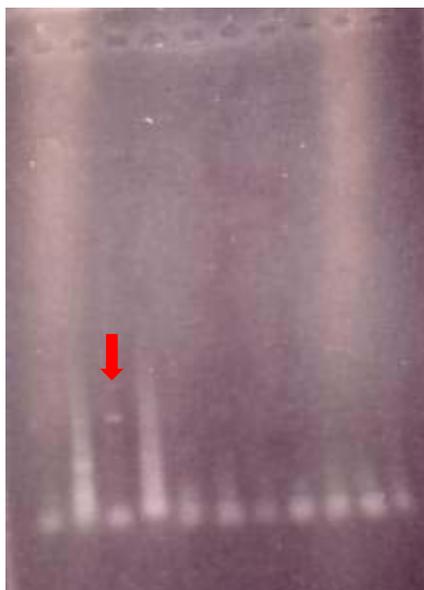
5.2. Resultado do PCR

Os produtos do PCR foram corridos através da técnica de eletroforese em um gel de agarose a 2%. Em uma amostra com diagnóstico de CCEO obtivemos o resultado positivo para HPV com leitura da banda na região de 450pb (figura 15), assim como para duas amostras de Papiloma. As demais amostras foram negativas para o HPV. Entretanto a afim de detectar a integridade do DNA nas amostras submetidas ao PCR, verificou-se que em 36 amostras (75%) não foi detectada a β -globina, enquanto que em 12 amostras (25%) foi possível a detecção desta proteína.

5.3. Correlação entre a expressão das proteínas p53 e pRb e positividade para HPV

Nas amostras de papiloma, nas quais o resultado do PCR foi positivo, em uma amostra o escore, tanto da proteínas p53 quanto da pRb, foi 0. Na segunda amostra com diagnóstico de papiloma e resultado do PCR positivo para HPV, os escores foram 0 e 1 para p53 e pRb, respectivamente. Na amostra com diagnóstico de CCEO e resultado de PCR positivo para HPV, os índices para p53 foi 2, enquanto para pRb foi 0.

Devido à pequena quantidade de amostras HPV positivas não foi possível associar o grau de expressão protéica, o diagnóstico e a presença do HPV.



- 1: Controle negativo
- 2: Controle Positivo
- 3: amostra positiva – detecção da banda 450pb
- 4: amostra negativa
- 5: amostra negativa
- 6: amostra negativa
- 7: amostra negativa
- 8: amostra negativa
- 9: amostra negativa
- 10: amostra negativa
- 11: amostra negativa

Figura 16. Detecção do DNA de HPV em gel de agarose a 2%

6. DISCUSSÃO

Alterações das proteínas p53 e pRb em diferentes tipos de células têm sido detectadas freqüentemente por técnicas como o *Southern*, *Northern* e *Western Blots*. Esses métodos, porém requerem extratos teciduais de biópsias tumorais, que incluem não somente células malignas, mas várias proporções de células normais, como fibroblastos, células inflamatórias e células epiteliais. O método de imunohistoquímica permite a detecção dos marcadores celulares expressos em células individuais e em populações específicas de células em tecido seccionado.

A importância e funcionalidade da p53 na regulação do ciclo celular está cada vez mais estabelecida na literatura. Os avanços obtidos nas técnicas de biologia molecular e genética têm possibilitado o estudo mais detalhado do papel da p53 no processo de carcinogênese.

Em condições de normalidade, a meia vida da p53 selvagem é de aproximadamente 6 a 20 minutos, entretanto quando mutada, a meia vida pode aumentar para 6 horas ou mais. Estudos têm proposto que uma vez mutada, a proteína p53 sofre alterações conformacionais e estruturais que a inativam e inviabilizam as função. A inativação é acompanhada pela estabilização, que aumenta consideravelmente a vida média e possibilita a identificação pelos métodos imunohistoquímicos. A expressão da p53 no núcleo da célula pelo método de imunohistoquímica representa, na grande maioria das vezes, a forma mutada. Estes fatores justificam, na literatura, a ausência ou uma leve imunoexpressão desta proteína em tecidos normais ou em neoplasia benignas, como o papiloma, ao passo

que uma alta imunexpressão é um fato observado em lesões malignas, denotando envolvimento ímpar da p53 no processo oncogénico. Estes fatos são condizentes com os resultados obtidos neste estudo em relação à expressão da p53 em lesões papilomatosas, sendo que a proteína não estava expressa em 94,7% das amostras e na única amostra (5,3%), na qual houve expressão protéica, esta apresentou escore 1. De acordo com a imunexpressão em tecidos histologicamente normais, 50% das amostras não apresentaram imunexpressão da p53, enquanto 50% apresentaram expressão da proteína em escore 1. A alta imunexpressão da p53 (50%) em tecidos histologicamente normais no presente estudo, fato este inesperado, pode ser justificado pela pequena quantidade de amostras de tecido histologicamente normal ou pelo fato do anticorpo monoclonal DO7 utilizado, detectar tanto a proteína no estado selvagem quanto no estado mutado. A detecção da p53 em seu estado selvagem pode ocorrer pelo aumento da transcrição em células rapidamente proliferativas, em resposta a danos persistentes ao DNA devido à ação de carcinógenos ou pela inativação de um fator necessário para a degradação da proteína p53 natural, como o Mdm2. Os tecidos obtidos e caracterizados como histologicamente normais, foram obtidos através dos laudos do Laboratório, o que poderia se supor tratar de uma lesões clinicamente suspeita ou podem ter sido excisados das margens de lesões proliferativas ou até mesmo malignas.

Em nenhuma das amostras de tecido normal e papiloma analisadas, esta marcação chegou ao escore 2 imunexpressão, ou seja, uma detecção superior a 50%, o que pode suportar as observações de que a superexpressão (escore 2), pode ser um indicador de transformação maligna. Porém, estudos feitos por Barzal-Norwosielska et al., em 2004, detectaram uma superexpressão da proteína p53 em

55% dos papilomas analisados. Esses resultados, porém, podem não estar sujeitos a comparações com os resultados obtidos neste estudo, devido à subjetividade dos escores e a ausência de um *cut-off* padrão para definir um caso positivo.

Os resultados deste estudo, com relação à detecção da proteína p53 em carcinomas bucais foi de 61,3% e estão de acordo com os achados de Nogueira et al. (2004), que detectou 55,8%. Nos carcinomas positivos para imunexpressão, 48,9% possuíam superexpressão (escore 2) para p53, achados superiores aos estudos feitos por Kusama *et al.*, (1996), que detectaram este índice em 33,3% das amostras e inferior aos estudos feitos por Nogueira *et al* em 2004, no qual a porcentagem de amostras com superexpressão foi de 78,9%. Porém nestes dois estudos citados anteriormente o *cut-off* estabelecido foi de 20%, e a uma superexpressão (escore 2) da p53 foi considerada nas amostras com imunexpressão superior a 60%. Na literatura falta uma padronização do *cut-off* e dos escores para a técnica de imuno-histoquímica, se tornando difícil a comparação entre os achados.

A ausência de imunexpressão detectável da p53 nos 38,7% dos casos de carcinoma pelo método de imuno-histoquímica não necessariamente indica a ausência de mutação. Visto que, apesar da maioria das mutações ocorrerem por mutações pontuais, em menor frequência, as mutações podem ser do tipo *nonsense*, que podem gerar um códon de parada, ou do tipo deleções em ambos os alelos do gen p53, inviabilizando a tradução, com a produção de proteínas instáveis, interferindo diretamente na sua expressão e detecção, uma vez que diferentes aspectos bioquímicos da proteína p53 podem estar diretamente relacionados ao padrão e ao grau de expressão. A formação de complexos de p53 na forma

selvagem com oncoproteínas virais, como a E6 dos HPV induz a degradação, reduzindo também os níveis intracelulares. Além disso, condições diversas de fixação do tecido também diminuem a sensibilidade da técnica, por modificar os epítomos.

Uma vez que a expressão tecidual da p53 relaciona-se, em diversos estudos, com grau histológico e estadió, o grau de diferenciação dos carcinomas foi analisado de acordo com a imunexpressão das proteínas p53 e pRb. Nos carcinomas pouco diferenciados, em nenhuma das amostras a imunexpressão para p53 foi negativa, resultado esse sustentado na literatura pelo fato de existir uma maior expressão (mutação) da p53 em lesões mais agressivas e proliferativas. Dos carcinomas moderadamente diferenciados e bem diferenciados 50% e 42,9% não apresentaram imunexpressão, respectivamente. O escore 2 foi detectado em 50% dos carcinomas moderadamente diferenciados e 42,9% bem diferenciados. No presente estudo não foi possível a detecção de diferença estatística entre os três graus de diferenciação no carcinoma em relação à imunexpressão da p53, apesar do potencial de malignização, através da análise da expressão da p53 ser fato suportado pela literatura, onde vários estudos verificam a detecção com expressão positiva crescente da p53 de hiperplasia para displasia e para carcinoma de células escamosas bucal, podendo ser utilizado como recurso preditivo e de prognóstico de lesões malignizáveis e malignas.

A correlação entre a detecção da pRb através de estudos imunohistoquímicos e a carcinogênese humana ainda não está muito claro na literatura, principalmente devido à diferença nos padrões de expressão desta proteína a depender do tipo e localização de câncer.

O método de imuno-histoquímica para avaliação da pRb não detecta o status protéico, não distinguindo a pRb mutante da pRb selvagem, assim como também detecta tanto a forma hipofosforilada como a hiperfosforilada da proteína. Portanto, a detecção da pRb não indica seu estado funcional.

No presente estudo, em 83,3% das amostras de tecido normal e em 73,3% das amostras de papiloma não houve detecção da pRb, enquanto que em 16,7% das amostras de tecido normal esta proteína estava expressa em escore 1. Nos papilomas esse índice foi de 26,1% para o mesmo escore. Os altos índices de ausência de detecção da proteína não foram esperados, visto que a pRb desempenha funções fisiológicas em tecidos normais, regulando a proliferação do ciclo celular. Porém, nenhuma das amostras de tecido normal ou papiloma se detectou escore 2 de imunoexpressão, enquanto que nos carcinomas detectamos este escore em 29% das amostras, sugerindo que a superexpressão desta proteína, assim como a p53, pode ser indicador de malignidade. Estudos sugerem que a superexpressão da pRb é capaz de bloquear a apoptose induzida pela p53 (HAUPT *et al.*, 1995), propiciando o desenvolvimento de neoplasias malignas. A maior detecção da pRb em lesões malignas pode ocorrer devido ao aumento proporcional de células proliferativas, justificável pelo fato da pRb hiperfosforilada aumentar nas fases G2 e M. O aumento da expressão da pRb em lesões malignas foi fato observado em estudos feito por zur Hausen *et al.*, (1999). Mutações do Rb, fato também associado desenvolvimento de carcinomas orais, podem resultar em expressão nuclear da proteína, justificando os índices de expressão protéica em neoplasias malignas no estudo realizado (61,3%).

A não detecção ou a diminuição da pRb pode ocorrer devido a mutações que resultam na ausência da codificação da proteína, o que pode justificar os 38,7% dos carcinomas nos quais não houve detecção protéica. Porém, a ausência de expressão da pRb é fato encontrado em maior frequência em diversos estudos, como nos estudos feitos por William (2000) e Koontongkaew et al (2000), nos quais a expressão da pRb estava ausente em 66% e 73,58% dos carcinomas escamocelulares orais, respectivamente, justificados pelo fato da maioria das mutações ou inativações do gene Rb resultar na ausência de expressão da proteína. A associação entre detecção da pRb com o hábito de fumar mostra, na literatura, uma diminuição da expressão desta proteína em pacientes fumantes, fato que não foi analisado neste estudo. A infecção viral pelos HPVs de alto risco resulta na degradação da pRb pela oncoproteína E7, o que também resulta na diminuição quantitativa da pRb, resultando em baixos índices de expressão.

A associação entre o grau de diferenciação dos carcinomas orais e a expressão da pRb não foi estatisticamente significativa, contrastando com estudos feitos com carcinomas escamocelulares da cérvix uterina, no qual houve diferença estatística entre o grau de diferenciação dessas lesões e a expressão da pRb, sendo esta maior em carcinoma bem diferenciados comparando com os carcinomas pouco diferenciados, fato justificável pela presença da pRb ser fator protetor contra apoptose, sendo fracamente detectada em tumores mais agressivos ou pouco diferenciados.

Os resultados obtidos neste estudo em relação ao papel pRb na carcinogênese oral são inconclusivos. Os resultados estão de acordo com alguns achados na literatura, mas contrários a outros. Na literatura existem poucos estudos associando

pRb à carcinogênese oral e a falta de uma padronização do *cut-off* e dos escores para a detecção imuno-histoquímica do pRb dificultam a comparação entre os diversos estudos.

A taxa de detecção do HPV em Carcinomas orais tem sido relatada em uma extensão de 0% a 100%, em vários trabalhos. Essa discrepância é atribuída, principalmente, à variação da sensibilidade das técnicas e metodologias empregadas, a fatores epidemiológicos dos grupos de pacientes examinados e ao tamanho da amostra.

A utilização da técnica de reação de cadeia de polimerase como metodologia no diagnóstico molecular do Papilomavírus Humano tem se mostrado como a mais sensível na identificação do DNA viral existente nos mais diversos materiais clínicos. Por ser um método muito sensível, é necessário controlar muito bem as condições de ensaio, a fim de eliminar os resultados falso-positivos. O presente estudo não permitiu definir a associação do HPV na mutação das proteínas p53 e pRb em lesões malignas e benignas na cavidade oral, em função do pequeno número de amostra com resultados positivos.

Apesar de ser uma técnica com grande aplicabilidade em materiais fixados e parafinizados, segundo estudos na literatura, a utilização deste tipo de material pode causar problemas devido ao tempo de fixação e o tipo de fixador usado pode afetar consideravelmente a qualidade dos ácidos nucléicos extraídos. Neste estudo a dificuldade de extração pode ser justificada pelo tipo de formol utilizado (formalina a 10%), cuja concentração degrada o material genético. O formol ideal utilizado para a

preservação do material genético, possibilitando uma boa extração, é o formol tamponado.

O fato de ter encontrado uma grande percentagem de amostras com a ausência de DNA íntegro sugere que tenham ocorrido poucos cuidados na fixação do tecido, porém a negatividade das amostras ao detectar o HPV pode ter sido influenciada por aspectos mencionados anteriormente.

7. CONCLUSÕES

- A detecção da p53, assim como o grau de imunexpressão, está diretamente relacionada ao desenvolvimento de neoplasias malignas.
- A imunexpressão da p53 está ausente ou fracamente expressa em neoplasias benignas.
- A pRb está expressa em maior frequência em carcinomas escamocelulares oral, enquanto que em papilomas orais esta proteína está expressa em baixa frequência.
- A superexpressão (escore 2) de p53 e pRb em lesões orais está relacionada à malignidade, não sendo encontrada em tecidos normais e papilomas orais;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADAMS, P.D.; KAELIN, W.G. **Transcriptional control by E2F**. Semin Cancer Biol, v.6, p.99-108, 1995
2. AGUIAR, M.C.F.; ARAÚJO, V.C. **p53 protein expression in lining epithelium adjacent to oral squamous cell carcinoma**. R.P.G. v.4, n.1, p14-19, jan-mar, 1997.
3. ALBERTS, B. ; JOHNSON, A. ; LEWIS, J. ; RAFF, M. ; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of The Cell**. Garland Science, 2002.
4. APELLA, E.; ANDERSON, C.W..**Signaling to p53: brake the posttranslation modification code**. Path.Biol (Paris) 48, 227-245, 2000
5. BÁLINT, É. ; VOUSDEN, K.H.; **Activation and Activities of The p53 Tumor Suppressor Protein**. British Journal of Cancer, v. 82, n. 12, p. 1813 –1823, 2001.
6. BARZAL - NOWOSIELSKA, M. ; MIASKO, A.; CHYCZEWSKI, L.;**Presences of Human Papillomavirus DNA (HPV) and Immunohistochemical p53 Overexpression in Papillomas of Oral Cavity**. Annales Academiae Medicae Bialostocensis, v. 49, p. 105 – 107, 2004.
7. BATES, S.;VOUSDEN, K. H.. **p53 in Signalling Checkpoint Arrest or Apoptosis**. Curr. Opin. Genet. Dev. , v. 6, p. 12 – 19, 1996.
8. BAUER, H.M.; MANOS, M.M. PCR ; **Detection of Genital Human Papillomavirus**. In: PERSING, D.H. ; SMITH, T.F. ; TENOVE, F.C. ; WHITE, T.J. ; **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**. American. Society for Microbiology, p.407- 413, 1993.
9. BENEDICT, W.F. ; XU, H.J. ; HU, S.X. E TAKAHASHI, R. ; **The Role of The Retinoblastoma Gene in Initiation and Progression of Human Cancer**. J. Clin. Invest, v. 85, p. 988 – 993, 1990.
10. BERNARDINI, S. ; ADESSI, G.L. ; BILLEREY, C.; CHEZY, E.; CARBILLET, J.P.;BITTARD, H. ; **Immunohistochemical Detection of Protein Over expression Versus Gene Sequencing in Urinary Bladder Carcinomas**. J Urol., v. 162, p. 1496 – 1501, 1999.
11. BERRY, D.E., LU, Y., SCHMIDT, B., FALLON, P.G., O'CONNEL, C., HU, S.X. ; XU, H. J. I.; BLANK, G.; **Retinoblastoma proteins inhibits IFN gamma induced apoptosis**. Oncogene; v. 12, p. 1809-19, 1996
12. BORAKS, S. ; **Diagnóstico Bucal**. Artes Médicas, cap.15, p. 265 – 277, 1996.

13. BOYER, S.N. ; WAZER, D.E. ; BAND, V. ; **E7 Protein of Human Papilloma Virus – 16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein Through the Ubiquitin – Proteasome Pathway.** Cancer Res., v. 56, p. 4620–4624, 1996.
14. BOUDA, M. ; GORGOULIS, V.; KASTRINASKI, N.G.; GIANNOUDIS, A.;TSOLI, E.; DANASSI-AFENTAKI, D.; FOUKAS, P.; KYROUDI, A.; LASKARIS, G.;HERINGTON, C.S.; KITTAS, C. **“High Risk” HPV Types are Frequently Detected in Potentially Malignant and Malignant Oral Lesions, but not in Normal Oral Mucosa.** Mod Pathol, v. 13, p. 644 – 653, 2000.
15. BRENNAN, S. M. F. ; SYRJANEN, K. J. ; **Regulation of cell Cycles is of Key Importance in Human Papillomavirus (HPV) – associated Cervical Carcinogenesis.** Revista Paulista de Medicina. v. 121(3), p.128 – 132, 2003.
16. BRUGAROLAS, J. ; MOBERG, K. ; BOYD, S.D. ; TAYA, Y.; JACKS, T. ; LEES, J.A. ; **Inhibition of Cyclin – Dependent Kinase 2 by p21 is Necessary for Retinoblastoma Protein – Mediated G1 Arrest After Gamma – Irradiation.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 96, p. 1002 – 1007,1999.
17. CADWELL, C., ZAMBETTI, G.P., **The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain of function on cell growth.** Gene v. 277, p. 15-30, 2001.
18. CHANG, F. ; SYRJÄNEN, S.; KELLOKOSKI, J.; SYRJÄNEN, K.; **Human Papillomavirus (HPV) Infections and Their Associations With Oral Disease.** J. Oral Pathol. Med., v. 20, p. 305 – 317, 1991.
19. CHETTY, R. BRAMDEV, A., AGUIERRE-ARETA, A., PEGORARO, R.J., SATAAR,N. **Relationship between retinoblastoma and proteins in human papillomavirus 16/18 positive and negative câncer of the uterine cervix.** J. Clin. Pathol. v.50: 413-416, 1997.
20. CLASSON, M. HARLOW, E..**The retinoblastoma tumour supressor in development and câncer.** Nat. Rev. Cancer 2, 910-919, 2002.
21. CORDON – CARDO, C. ; **Mutation of Cell Cycle Regulators: Biological and Clinical Implications for Human Neoplasia.** American Journal of Pathology, v. 147, p. 545 – 560, 1995.
22. CROOK, T. ; VOUSDEN, K.H. ; **Interaction of HPV E6 With p53 and Associated Proteins.** Biochem. Soc. Trans., v. 22, p. 52 – 55, 1994.
23. DeGREGORI, J. ; G. LEONE ; A. MIRON ; L. JAKOI ; J.R. NEVINS ; **Distinct Roles for E2F Proteins in Cell Growth Control and Apoptosis.** Proc. Natl. Acad. Sci., v. 94, p. 7245 – 7250, 1997.

24. DeROBERTIS, E.M.F. ; HIB, J.; **Bases da Biologia Celular e Molecular.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 3 ed., 2001.
25. DIAS, E.M. ; **Tbx2 Is Overexpressed and Plays an Important Role in Maintaining Proliferation and Suppression of Senescence in Melanomas.** *Cancer Research*, v. 65, p. 2260 – 2268, 2005.
26. DOORBAR, J., **The Papillomavirus life cycle.** *Journal of Clinical Virology*; v. 32S, p. S7-S15, 2005
27. DYSON, N. ; **The Regulation of E2F by pRB- Family Proteins.** *Genes Dev.*, v. 12, p. 2245 – 2262, 1998.
28. EI – DEIRY, W. S. ; TOKINO, T. ; VELCULESCU, V.E. ; LEVY, D.B.; PARSONS, R. ; TRENT, J.M. ; LIN, D. ; MERCER, W.E. ; KINZLER, K W. ; VOGELSTEIN, B. ; **WAF1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression.** *Cell*, v. 75, p. 817 – 825, 1993.
29. FAN, G.K. ; CHEN, J. ; PING, F. ; GENG, Y. ; **Immunohistochemical Analysis of P57 (Kip2), p53 and hsp60 Expressions in Premalignant and Malignant Oral Tissues.** *Oral Oncology*, v. 42, p. 147 – 153, 2006.
30. FINLAY, C.A. ; HINDS, P.W. ; LEVINE, A.J. ; **The p53 Proto – Oncogene Can Act as a Suppressor of Transformation.** *Cell*, v. 57, p. 1083 – 1093, 1989.
31. FRANCESCHI, S. ; TALAMINI, R. ; BARRA, S. ; BARON, A.E. ; NEGRI, E. BIDOLI, E. ; BIDDI, E.. **Smoking and Drinking in Relation to Cancer of The Oral Cavity, Pharynx, Larynx, and Esophagus in Northern Italy.** *Cancer Res.*, v. 50, p. 6502 – 6507, 1990.
32. FRIEDRICH, R.E. ; GIESE, M. ; RIETHDORF, S. ; LONING, T. ; **p53-Mutation in Smears of Oral Squamous Cell Carcinoma.** *Anticancer Res*, v. 20, p. 4927 – 4930, 2000.
33. FRANCIS, D.A., SCHMID, S. I., HOWLEY, P.M., **Repression of integrated papillomavirus E6/E7 promoter in required for growth suppression of cervical cancer cell.** *J. Virol.* V. 74, p. 2679-2686, 2000
34. FUNK, W. D. ; PAK, D. T. ; KARAS, R.H.; WRIGHT, W.E. ; SHAY, J. W. ; **A Transcriptionally Active DNA – binding site for Human p53 protein complexes.** *Mol. Cell. Boil.*, v. 12, p. 2866 – 2871, 1992.
35. FURUKAWA, Y. ; DeCAPRIO, J.A. ; BELVIN, M. ; GRIFFIN, J.D. ; **Heterogeneous Expression of the Product of the RB Gene in Primary Human Leukemia Cells.** *Oncogene*, v. 6, p. 1343 – 1346, 1991.

36. GERADTS, J. ; HU, S.X. ; LINCOLN, C.E. ; BENEDICT, W.F. ; XU, H.J. ; **Aberrant RB Gene Expression in Routinely Processed, Archival Tumor Tissues Determined by Three Different Anti- RB Antibodies.** *Int. j. Cancer* , v. 58, p. 161 – 167, 1994.
37. GILLISON, M.L.; KOCH, W.M.; CAPONE, R.B. ; SPAFFORD, M. ; WESTRA, W.H. ; WU, L. ; ZAHURAK, M.L. ; DANIEL, R.W. ; VIGLIONE, M. ; SYMER, D.E. ; SHAH, K.V. ; SIDRANSKY, D. ; **Evidence for a Casual Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers.** *J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda)*, v. 92, p. 709 – 720, 2000.
38. GIACCIA, A. J.; AND KASTAN, M. B.; **The Complexity of p53 Modulation: Emerging Patterns from Divergent Signals.** *Genes Dev.*, v. 12 , p. 2973 – 2983, 1998.
39. GLEICH, L.L., SALAMONE, F.N., **Molecular genetics of head and neck cancer.** *Cancer Control*, v. 9, p. 369-378, 2002
40. GRANA, X. ;REDDY, E.P. ; **Cell Cycle Control in Mammalian Cells: Role of Cyclin Dependent Kinases (CDKs), Growth Suppressor Genes and Cyclin Dependent Kinase Inhibitors (CKIs).** *Oncogene* , v. 11, p. 211 – 219, 1995.
41. GRINSTEIN, E. ; SHAN, Y.; KARAWAJEW, L.; SNIJDERS J. F. P.; MEIJER J. L. M. C.; ROYER, H – D. ; WERNET P.; **Cell Cycle-controlled Interaction of Nucleolin with the Retinoblastoma Protein and Cancerous Cell Transformation.** *The Journal of Biological Chemistry* . v. 281,n. 3, p. 22223 – 22235, 2006.
42. GUILLOUF, C. ; F. ROSSELLI ; K. KRISHNARAJU ; E. MOUSTACCHI ; B. HOFFMAN ; D.A. LIEBERMANN; **p53 Involvement in Control of G2 Exit of the Cell Cycle: Role in DNA Damage – Induced Apoptosis.** *Oncogene*, v. 10, p. 2263 – 2270, 1995.
43. GUTIÉRREZ, E.I.C. ; GARZA, C.H.L. ; **Papilomavirus Humano, Biología Molecular y Patogeneses.** *Revista Salud Publica y Nutricion*, v. 2, n 2, 2001.
44. HAAS- KOOGAN, D.A., KOGAN, S.C., DAZIN, P., T'ANG, A., FUNG, Y.K., et al., **Inhibition of apoptosis by retinoblastoma gene product.** *EMBO J*; v. 14 p. 461-72, 1996
45. HARRIS, C.C. ; **p53 Tumor Suppressor Gene: From Basic Research Laboratory to The Clinic: an Abridged Historical Perspective.** *Carcinogenesis* , v. 17, p. 1187 – 1198, 1996.
46. HAUPT, Y.; ROWAN, S.; SHAULIAN, E., VOUSDEN, K.H.; OREN, M.**Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53.** *Genes Dev.* V.9, p: 2170-2183, 1995.

47. HERWIG, S. ;STRAUSS M. . **The Retinoblastoma Protein: a Master Regulator of Cell Cycle, Differentiation and Apoptosis.** Eur. J. Biochem. , v. 246, p. 581 – 601, 1997.
48. HICKMAN, E.S. ; MORONI, M.C. ; HELIN, K. ; **The Role of p53 and pRB in Apoptosis and Cancer.** Current Opinion in Genetics e Development, v. 12, p. 60 – 66, 2002.
49. HOLLSTEIN, M. ; SIDRANSKY, D. ; VOLGELSTEIN, B. ; HARRIS, C.C.. **p53 Mutations in Human Cancers.** Science, v. 253, p. 49 – 53, 1991.
50. HOROWITZ, J.M. ; PARK, S.H. ; BOGENMANN, E. ; CHENG, J.; YANDELL, D.W.; KAYE, F.J.; MINNA, J.D.; DRIJA, T.P.; WEINBERG, R.A. **Frequent Inactivation of the Retinoblastoma Antioncogene is Restricted to a Subset of Human Tumor Cells.** Proc. Natl. Acad. Sci.,USA, v. 87, p. 2775 – 2779, 1990.
51. HUANG, H.J. ; YEE, J.K. ; SHEW, J.Y. ; BROOKSTEIN, R.; SCULLY, P.; LEE, W.H.. **Suppression of the Neoplastic Phenotype by Replacement of the Rb Gene in Human Cancer Cells.** Science, v. 242, p. 1563 – 1566, 1988.
52. HUET, X. ; J. RECH ; A. PLENT ; A. VIE ; J.M. BLANCHARD ; **Cyclin A Expression is Under Negative Transcriptional Control During The Cell Cycle.** Mol. Cell. Biol., v. 16, p. 3789 – 3798, 1996.
53. HUNTER, T.; PINES, J. ; **Cyclins and Cancer. II: Cyclin D and CDK Inhibitors Come of Age.** Cell, v. 79, p. 573 – 582, 1994.
- 54.HWNAG, S. G.; LEE, D.; KIM, J.; SEO, T.; SHOE, J.; **Human Papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1-driven transcription in a Retinoblastoma protein-independent Manner.** The Journal of Biological Chemistry, v. 277, n.4, p.2923-2930, 2002
55. JEFFRIES, S. ; EELES, R. ; GOLDGAR, D. **The Role of Genetic Factors in Predisposition to Squamous Cell Cancer of The Head and Neck.** Br. J. Cancer, v. 79, p. 865 – 867, 1999.
- 56 JONES, D.L.; R.M. ALANI ; K. MUNGER; **The Human Papillomavirus E7 Oncoprotein can Uncouple Cellular Differentiation and Proliferation in Human Keratinocytes by Abrogating p21Cip1 – Mediated Inhibition of cdk2.** Genes Dev., v. 11, p. 2101 – 2111, 1997.
- 57 JUAN, L. J. ; SHIA, W. J. ; CHEN, M. H. ; YANG, N.M.; SETO, E.; LIN, Y.S.; WU, C. W.. **Histone Deacetylases Specifically Down – Regulated p53 – Dependent Gene Activation.** J. Biol. Chem. , v. 275 (27), p. 20436 – 20443, 2000.

58. KAELIN, W.G. ; **Recent Insights into The Functions of The Retinoblastoma Susceptibility Gene Product.** Cancer Investigation, v. 15, p. 243 – 254, 1997.
59. KANESHIMA, E.N.; BIDOIA, C. C. G.; GABRIEL, M.; SUZUKI, L. E.; CONSOLARO, M. E. L.. **Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no LEPAC, Universidade Estadual de Maringá.** Acta Scientiarum v. 23, n. 3, p. 731-737, 2001.
60. KASTAN, M. B. ; **Molecular Biology of Cancer: The Cell Cycle.** In : De Vitta VT, Helman S., Rosenberg S., editors. **Cancer: Principles e Practice of Oncology.** 5. Ed. Philadelphia. Lippincott – Raven, p. 121 – 133, 1997.
61. KE, L.D; **Expression of human papillomavirus E7 mRNA in human oral and cervical neoplasia and cell lines.** Oral oncol, v. 35, p. 415-120, 1999.
62. KIRNBAUER, R. ; TAUB, J. ; GREENSTONE, H. ; RODEN, R.; DURST, M. ; GISSMANN, L. ; LOWY, D. R. ;SCHILLER, J.T. ; **Efficient Self Assembly of Human Papillomavirus Type 16 L1 and L1-L2 into Virus– Like Particles.** J. Virol., v. 67, p. 6929, 1993.
63. KLUMB, C. E., CAVALCANTI JUNIOR, G.B., **Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína p53 nas neoplasias linfóides.**Rev. Brás hematol hemoter, v. 24 (2), p. 111-125, 2002
64. KO, Y.C. ; HUANG, Y.L.; LEE, C.H. ; CHEN, M.J. ; LIN, L.M. ; TSAI, C.C. ; **Betel Quid Chewing, Cigarette Smoking and Alcohol Consumption Related to Oral Cancer in Taiwan.** J. Oral Pathol. Med., v. 24, p. 450 – 453, 1995.
65. KOONTONGKAEW, S.; CHAREONKITKAJORN, L.; CHANVITAN, A.; LEELAKRIANGSAK, M.; AMORNPHIMOLTHAM.. **Alteration of p53, pRb, cyclin D and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinoma.** Oral Oncology. V. 36, p. 334-339, 2000.
66. KUMAR, V. ; FAUSTO, N.; ABBAS, A.K . ; **Robbins & Cotran Patologia Bases Patológicas das Doenças.** Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.
67. KUSAMA, K.; OKUTSU, S.; TAKEDA, A.; HIMIYA, T.; KOJIMA, A.; KIDOKORO, Y.; CHU, L.; IWANARI, S.; KUDO, I.; MURO, I.. **p53 gene alteration ando p53 protein in oral epithelial dysplasia and squamous cel carcinoma.** J. Pathol., v.178, p. 415-421, 1996
68. LAZARUS, P. ; STERN, J. ; ZWIEBEL, N. ; FAIR, A. ; RICHIE, J.P. JR ; SCHANTZ, S. ; **Relationship Between p53 Incidence in Oral Cavity Squamous Cell Carcinomas and Patient Tobacco Use.** Carcinogenesis, v. 17, p. 733 – 739, 1996.

69. LEE, E. Y, CHANG, C.Y., HU, N., LAI, C.C., HERRUP, K., **Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and hematopoiesis**, Nature; v. 359, p. 288-94, 1992
70. LEE, J.O., RUSSO, A.A., PAVLETICH, N.P. **Structure of retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to peptide from HPV E7**. Nature, v. 391, p. 859-865, 1998.
71. LEVINE, A. J.; **p53 the Cellular Gatekeeper for Growth and Division**. Cell, v. 88, p. 323 – 331, 1997.
72. LEVINE, A.J. ; MOMAND, J.; FINLAY, C.A. ; **The p53 Tumour Suppressor Gene**. Nature, v. 351, p. 453 – 456, 1991.
- 73 LI, Y. ; GRAHAM, S. ; LACY, A. ; M.V. DUNCAN; P. WHYTE ; **The Adenovirus E1a – Associated 130 – kD Protein is Encoded by a Member of The Retinoblastoma Gene Family and Physically Interacts with Cyclins A and E**. Genes Dev., v. 7, p. 2366 – 2377, 1993.
74. LIN, D. ; M.T. SHIELDS ; S.J. ULLRICH ; E. APPELLA ;W.E. MERCER ; **Growth Arrest Induced by Wild – Type p53 Protein Blocks Cells Prior to or Near the Restriction Point in Late G1 Phase**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 89, p. 9210 – 9214, 1992.
75. LITTLE, J.W. ; **Papillomaviruses: The Current Status in Relation to Oral Disease**. Oral Surg. Oral Med Oral Pathol., v. 65, p. 526 – 532, 1988.
76. LOEB, K.R. ; LOEB, L.A. ; **Significance of Multiple Mutations in Cancer**. Carcinogenesis, v. 21, p. 379 – 385, 2000.
77. LOCKER, J. **Tumour supressor gene and practice of cirurgical pathology**. Hum Pathol., 1995; v. 26 (4), p. 359-361
78. LOYOLA, A. M.; BORRA, R. C.; ARAÚJO, V. C.. **Expressão da proteína p53 em carcinomas epidermóides da cavidade bucal**. RPG- Rev. Pós. Grad, v.12, n.2, p.52-58, 1995.
79. LUDLOW, J.W.; GLENDENING, C.L.; LIVINGSTON, D.M.;DeCAPRIO, J.A. ; **Specific Enzymatic Dephosphorylation of The Retino- Blastoma Protein**. Mol. Cell Biol., v. 13, p. 367 – 372, 1993.
80. MASHBERG, A. ; BOFFETTA, P. ; WINKELMAN, R. ; GARFINKEL, L. ; **Tobacco Smoking, Alcohol Drinking, and Cancer of The Oral Cavity and Oropharynx Among U.S. Veterans**. Cancer, v. 72, p. 1369 – 1375, 1993.
81. MILLER, C.S. ; WHITE, D.K. ; **Human Papillomavirus Expression in Oral Mucosa, Premalignant Conditions, and Squamous Cell Carcinoma; a**

- Restrospective Review of the Literature.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Pathol Oral Radio Endod., v. 82, p. 48 – 57, 1996.
82. MOLL, U.M., SCHRAMM, L.M. **p53: An acrobat in tumorigenesis.** Crit Rev Oral Biol Med. V. 9, p. 23-37, 1998;
83. NEVILLE, B.W. ; DAMM, D.D. ; ALLEN, C.M.E.; BOUQUOT, J.E.; **Patologia Oral e Maxilofacial.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2004.
84. NICULESCU, A.B. ; CHEN, X. ; SMEETS, M. ; HENGST, L. ; PRIVES, C. ; REED, S.I. ; **Effects of p21 (Cip1- Waf1) at Both the G1 and The G2-M Cell Cycle Transitions: pRb is a Critical Determinant in Blocking DNA Replication and in Preventing Endoreduplication.** Mol. Cell. Biol., v. 18, p. 629 – 643, 1998.
85. NOGUEIRA, R. L. M., LIMA, G.M., RABENHORST, S. H.B., FERREIRA, V. A.; **Deteção da p53 em lesões benignas e malignas da mucosa bucal correlação com a hábito de fumar.** Rev. de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, v. 4, p.33-62, 2004.
86. OLIVIER, M. ; EELES, R. ;HOLLSTEIN, M. ; KHAN, M.A. ; HARRIS, C.C.; HAINAUT, P. ; **The IARC TP53 Database: New Online Mutation Analysis and Recommendations to User.** Hum. Mutat., v. 19, p. 607 – 614, 2002.
87. PAPANITRAKOPOULOU, V.; IZZO, J.; LIPPMAN, S.M.. Frequent inactivation of p16 INK 4a in oral premalignant lesions. Oncogene, 14, p. 1799-1803, 1997.
88. PARK, N.H.; KANG, M.K.; **Genetic Instability and Oral Cancer.** Electronic Journal of Biotechnology, v. 3, p. 65 – 71, 2000.
89. PILLAI, M. R.; NAIR, M. K. ; **Development of a Condemned Mucosa Syndrome and Pathogenesis of Human Papillomavirus – associated Upper Aerodigestive Tract and Uterine Cervical Tumors.** Exp. Mol. Pathol., v. 69 (3) , p. 233 – 241, 2000.
90. PISANI, P. ; PARKIN, D.M. ; FERLAY, J. ; **Estimates of The Worldwide Mortality From Eighteen Major Cancers in 1985. Implications for Prevention and Projections of Future Burden.** International Journal of Cancer , v. 55, p. 891 – 903, 1993.
91. PLUQUET, O.; HAINAUT, P.; **Genotoxic and Non-Genotoxic Pathways of p53 Induction.** Cancer Lett, v. 174, p. 01 – 15, 2001.
92. RAPP, L. ; CHEN, J.J. ; **The Papillomavirus E6 Proteins.** Bioch Biophys Acta, v. 1378, p. 01- 19, 1998.

93. REGEZI, J.A. ; SCIUBBA, J.J. ; **Patologia Bucal: Correlações Clínico patológicas**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993.
94. RIES, J.C.; SCHREINER, D.; STEININGER, H.; GIROD, S.C. ; **p53 Mutation and Detection of p53 Protein Expression in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma**. *Anticancer Res.*, v.18, p. 2031 – 2036, 1998.
95. RIVOIRE, W. A.; CAPP, E.; CORLETA, H. E.; SILVA, I.S.B.; **Bases Biomoleculares da Oncogênese Cervical**. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 2, n.47, p. 179-184, 2001.
96. ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E.R.; LUCON, A.M.; PEREYRA, E.A.G.; **HPV na prática clínica**. São Paulo. Ed. Atheneu, p.1-42, 2005.
97. SAKAI, E., TSUCHIDA, N., **Most human squamous cell carcinoma in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes**. *Oncogene* 1992; 7:927-33.
98. SARRUF, M.B.J.M. ; DIAS, E.P. ; **Avaliação Citopatológica da Cavidade Bucal em Pacientes Portadores de Infecção Genital pelo Papilomavírus Humano (HPV)**. *J. Bras. Doenças Sex. Trans.*, v. 9, p. 04 – 18, 1997.
99. SHAFER, W.G. ; HINE, M.K. ; LEVY, I.M. ; **Tratado de Patologia Bucal**. 4 ed, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, p. 80 – 212, 1987.
100. SHERR, C.J.. **Cancer cell cycle**. *Science* 274, p.1672-1677, 1996
- 101 SHIMA, K. ; KOBAYASHI, I. ; SAITO, I. ; KIYOSHIMA, T.; MATSUO, K.; OZEKI, S.; OHISHI, M.; SAKAI, M.. **Incidence of Human Papillomavirus 16 and 18 Infection and p53 Mutation in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma in Japan**. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v. 38; p. 445- 450, 2000.
- 102.SITTEL, C.; RUIZ, S.; VOLLING, P.; KVASNICKA, H.M. ; JUNGCHULSING,M. ; ECKEL, H.E. ; **Prognostic Significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in Cancer of The Oropharynx and Oral Cavity**. *Oral Oncol*, v. 35, p. 583 – 589, 1999.
103. SMITH, M.L. ; CHEN, I.T. ; ZHAN, Q. ; O'CONNOR, P.M. ; FORNACE, A.J.J. : **Involvement of The p53 Tumor Suppressor in Repair of U.V. – Type DNA Damage**. *Oncogene* , v. 10, p. 1053 – 1059, 1995.
- 104.SNIJDERS, P.J.F.; STEENBERGEN, R.D.M.; MEIJER, C.J.L.M. ; WALBOOMERS, J.M.M. ; **Role of Human Papillomavirus in Cancer of the Reepiratory and Upper Digestive Tract** . *Clin. Dermatol.*, v. 15, p. 415 – 425, 1997.

105. SOUTHERN, S.A. ; HERRINGTON, C.S. ; **Dsruptions of Cell Cycle Control by Human Papillomaviruses With Special Reference to Cervical Carcinoma.** Int. J. Gynecol. Cancer, v. 10, p. 263 – 274, 2000.
106. SUGERMAN, P.B. ; SHILLITOE, E.J.; **The High Risk Human Papillomaviruses and Oral Cancer: Evidence for and Against a Causal Relationship.** Oral Dis., v. 3, p. 130 – 147, 1997.
107. SYRJANEN, K. J.; **Human papilomavirus lesions in association with cervical dysplasia and neoplasias.** The American College of Obstetricians and Gynecologists, v.62, p. 617-624, 1983.
108. SYRJANEN, S.M. ; SYRJANEN, K.J. ; **New Concepts on the Role of Human Papillomavirus in Cell Cycle Regulation.** Ann Med., v. 31, p. 175 – 187, 1999.
109. TERAJ, M. ; BURK, R.D. ; **Complete Nucleotide Sequence and Analysis of a Novel Human Papillomavirus (HPV 84) Genome Cloned By an Overlapping PCR Method.** Virology, v. 279, p. 109 – 115, 2001.
110. TERAJ, M. ; TAKARI, M.; MATSUKURA, T.; SATA, T.. **Oral Wart Associated With Human Papillomavirus Type 2.** J. Oral Pathol. Med., v. 28, p. 137 – 140, 2001.
111. THOMAS, M. ; PIM, D. ; BANKS, L. ; **The Role of the E6-p53 Interaction in the Molecular Pathogenesis of HPV.** Oncogene, v. 18, p. 7690 – 7700, 1999.
112. TODD, R. ; DONOFF, R.B. ; WONG, DTW. ; **The Molecular Biology of Oral Cancer: Toward Tumour Progression Model.** J. Oral Maxillofac Surg., v. 55, p. 613 – 623, 1997.
113. TOMMASI, A.F. ; **Diagnóstico Bucal.** São Paulo, Pancas, 2002.
- 114 .UCHIDA, T. ; WADA, C. ; ISHIDA, H. ; WANG, C. ; EGAWA, S. YOKOYAMA, E. ; KAMEYA, T. ; KOSHIBA, K. ; **p53 Mutations and Prognosis in Bladder tumors.** J. Urol., v. 153, p. 1097 – 1104, 1995.
115. UZVOLGYI, E. ; CLASSON, M. ; HENRIKSSON, M.. **Reintroduction of a Normal Retinoblastoma Gene in Osteosarcoma Cells Inhibits the Replication Associated Function of SV40 Large T Antigen.** Cell Growth Differ, v. 2, p. 297 – 303, 1991.
116. VOGELSTEIN, B. ; LANE, D. ; LEVINE, A.J. ; **Surfing the p53 Network.** Nature, v. 408, p. 307 – 310, 2000.
117. VOUSDEN, K.H. **Regulation of the cell cycle by viral oncoproteins,** Semin Canc Biol, v.6, p109-116, 1995

118. XAVIER, S.D. ; FILHO, I.B. ; LANCELLOTTI, C.L.P. ; **Prevalência de Achados Sugestivos de Papilomavírus Humano (HPV) em Biópsias de Carcinoma Espinocelular de Cavidade Oral e Orofaringe: Estudo Preliminar.** Rev. Bras. Otorrinolaringol., v. 71, p. 510 – 514, 2005.
119. WANG, X.W. ; HARRIS, C.C. ; **p53 Tumor – Supressor Gene: Clues to Molecular Carcinogenesis.** J. Cell. Physiol., v. 173, p. 247 – 255, 1997.
- 120 .WERNESSE, B. A., LEVINE, A.J., HOWLEY, P.M., **Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 protein with p53.** Science; v. 248, p.76-79, 1990
- 121 WILLIAMS, H. K. **Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma.** J Clin Mol Pathol, v. 53, p. 165-72, 2000
122. WONG, Y.K., LIU, C.J.; GHANG, K.W.. **p53 alteration in betel-quit and tobacco associated oral cell carcinomas from Taiwan.** J. Oral Pathol Med, v.27, n 6, p. 243-8, July, 1998
123. WHYTE, D. A. ; BROTON, C.E. ; SHILLITOE, E. J. ; **The Unexplained Survival of Cells in Oral Cancer: What is The Role of p53 .** J. Oral Pathol. Med., v. 31, p. 25 – 33, 2002.
- 124.YAMAGUCHI, T. ; SHINDOH, M. ; AMEMIYA, A. ; INOUE, N. ; KAWAMURA, M. ; SAKAOKA, H. ; INOUE, M.; FUJINAGA, K... **Detection of Human Papillomavirus Type 2 Related Sequence in Oral Papilloma.** Analytical Cellular Pathology, v. 16, p. 125 – 130, 1998.
125. ZAHA, A. ; FERREIRA, H.B. ; PASSAGLIA, L.M.P. ; **Biologia Molecular Básica.** 3 ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.
126. ZERFASS – THOME, K. ; W. ZWERSCHKE ; B. MANNHARDT ; R. TINDLE ; J.W. BOTZ ; P. JANSEN – DURR ; **Inactivation of the cdk Inhibitor p27KIP1 by the Human Papillomavirus type 16 E7 Oncoprotein.** Oncogene, v. 13, p. 2323 – 2330, 1996.
- 127 ZEGARELLI, E.V.. **Diagnóstico das Doenças da Boca e dos Maxilares.** Guanabara Koogan, v. 598p., cap.8, p. 174 – 315, 1982.
128. ZHANG, L. ; ROSIN, M. ; PRIDY, R. ; XIAO, Y. ; **p53 Expression During Multistage Human Oral Carcinogenesis.** Int. J. Oncol., v. 3, p. 753 – 739, 1993.
129. zur HAUSEN, H. ; **Papillomavirus Infections – a Major Cause of Human Cancers.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1288, p. 55 – 78, 1996.

- 130.zur HAUSEN, A.; SARBIA, M.; HEEP, H.; WILLERS, R.; GABBERT, H.E..
**Retinoblastoma protein (pRb) expression and prognosis in squamous cell
of the oesophagus.** Int. J. Cancer. v.84, p. 618-622, 1999.
131. ZWICKER, J.; LIU, N.; ENGELAND, K.; LUCIBELLO, F. C.; MÜLLER, R.; **Cell
cycle regulation of E2F Site Occupation in Vivo.** Science, v.271, n. 5255, p.
1595-1597, 1996.