

Cláudia Teixeira Sá Cabral

**Estudo comparativo da
imunomarcção da p53 em
carcinomas epidermóides bucais de
sítios anatômicos diferentes**

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Odontologia
Belo Horizonte - MG
2003

Cláudia Teixeira Sá Cabral

**Estudo comparativo da
imunomarcação da p53 em
carcinomas epidermóides bucais de
sítios anatômicos diferentes**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Estomatologia

Orientadora: Prof^a Dr^a. Maria Auxiliadora Vieira do Carmo.

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Odontologia
Belo Horizonte – MG
2003

Aos meus pais Cláudio e Áurea,

sempre presentes.

Ao Alex,

com amor.

À Professora Maria Auxiliadora Vieira do Carmo,

pela confiança,
pelo apoio,
pelo incentivo,
pela oportunidade de convívio,
pela amizade,
pelo exemplo,

a minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

À professora Maria Auxiliadora Vieira do Carmo, pela sua valiosa orientação;

Aos professores Maria Cássia Ferreira Aguiar, Ricardo Alves de Mesquita e Linaena Mércy da Silva Fonseca, por todo apoio, atenção e amizade a mim oferecidos;

Aos coordenadores deste Mestrado, professores Ricardo Santiago Gomez, Regina de Fátima Feio Barroso e à professora Isabela de Almeida Pordeus, pelo empenho na minha vinda a Belo Horizonte;

Ao colega Sérgio Vitorino Cardoso, pela grande ajuda durante todas as etapas de execução deste trabalho;

Às funcionárias do laboratório de Patologia Bucal, Inês e Maria (*in memoriam*), e à aluna Vívian, pela colaboração durante as fases de preparação dos cortes e realização da técnica imunoistoquímica;

Ao Tribunal Regional Eleitoral do Pará e ao Instituto de Previdência e Assistência do Município de Belém, pelas licenças concedidas que possibilitaram minha vinda a Belo Horizonte;

Às colegas Soraya, Mariela e, em especial, Aline, pela companhia e amizade;

Aos colegas de mestrado, pela amizade, colaboração e convívio harmonioso, e em particular, a Simone, grande amiga e incentivadora;

A minha família e, com carinho especial, a Áurea e Almira, que me apoiaram e fizeram companhia durante minha estada em Belo Horizonte.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	08
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE TABELA	10
LISTA DE GRÁFICOS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
RESUMO	15
SUMMARY	16
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA	21
2.1.1 Carcinoma epidermóide de língua	26
2.2 p53	31
2.2.1 p53 e o ciclo celular	36
2.2.2 p53: função, ativação, degradação e estabilização	39
2.2.3 p53 e o câncer	41
2.2.4 p53 e o câncer de língua	56
3 OBJETIVOS	61
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	64
4.2 TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA	65
4.3 CONTAGEM DAS CÉLULAS	67
4.4 ESTUDO ANATOMOPATOLÓGICO	67
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	68

5 RESULTADOS	70
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÕES	99
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Porcentagens de casos imunopositivos para a proteína p53 em carcinomas epidermóides da cavidade bucal.....	60
QUADRO 2	Sistema de graduação histológica para carcinoma epidermóide de boca, proposto por Bryne et al. (1992).....	68

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Padrão de imunomarcção da p53 – caso controle positivo, aumento de 100x.....	73
FIGURA 2	Padrão de imunomarcção da p53 – caso controle positivo, aumento de 400x.....	74
FIGURA 3	Imunomarcção da p53 no epitélio adjacente ao tumor, aumento de 400x.....	82
FIGURA 4	Maior padrão de imunomarcção da p53 nas células periféricas das ilhotas tumorais, aumento de 400x.....	83
FIGURA 5	Padrão difuso de imunomarcção da p53, aumento de 400x.....	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Distribuição dos pacientes em estudo, segundo sexo, idade e sítio anatômico primário da lesão.....	72
TABELA 2	Distribuição da imunomarcção para p53 nos carcinomas epidermóides, de acordo com o sítio anatômico primário.....	75
TABELA 3	Média e desvio padrão dos índices de marcação para p53 nos carcinomas epidermóides, de acordo com o sítio anatômico primário.....	76
TABELA 4	Comparação entre a marcação de p53 e as variáveis clinicopatológicas dos casos de carcinoma epidermóide da cavidade bucal.....	79
TABELA 5	Distribuição dos pacientes em estudo, segundo sítio anatômico primário, graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral (GHM-FIT) e imunomarcção para p53.....	80
TABELA 6	Distribuição da imunomarcção para p53 nos carcinomas epidermóides, de acordo com a graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral (GHM-FIT).....	81

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** Comparação dos índices de imunomarcção para a proteína p53, de acordo com o sítio anatômico primário da lesão..... 76
- GRÁFICO 2** Distribuição dos índices de imunomarcção para a proteína p53, de acordo com a idade dos pacientes..... 77
- GRÁFICO 3** Distribuição dos índices de imunomarcção para a proteína p53, segundo o gênero..... 78
- GRÁFICO 4** Distribuição da imunomarcção para a proteína p53 nos carcinomas epidermóides, de acordo com a graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral..... 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4NQO	- 4-nitroquinolina-1-óxido.
APC	- Refere-se ao gene <i>adenomatous polyposis coli</i> .
ARF	- Refere-se ao gene supressor de tumor <i>alternate reading frame</i> .
ATM	- Refere-se ao gene <i>ataxia telangiectasia mutated</i> .
B[a]P	- Benzopireno.
bcl-2	- Refere-se à proteína <i>B cell lymphoma/leukemia</i> , ligada à apoptose.
c-erbB-2	- Refere-se à proteína ou ao gene membro da família de receptores EGF (fator de crescimento epidérmico).
Codon	- Porção do DNA (três pares de nucleotídeos em comprimento) ou RNA (três nucleotídeos em comprimento) que codificam um único aminoácido.
CpG	- Do inglês <i>CpG Islands</i> – refere-se à região do DNA genômico rica em dinucleotídeos CG.
DMBA	- 7,12-dimetilbenzantraceno.
DNA	- Ácido Desoxiribonucleico.
DSS	- Do inglês <i>Disease Specific Survival</i> – Sobrevida doença-específica.
EDTA	- Do inglês <i>EthyleneDiamine Tetraacetic Acid</i> – Ácido etilenodiamino tetracético.
Exon	- Seqüência de bases, codificadora de proteína, do DNA de um determinado gene.
Frameshift	- Tipo de mutação que resulta da inserção ou deleção de um único nucleotídeo em um quadro de leitura aberto na seqüência normal do DNA.
G1	- No ciclo celular, representa o intervalo pós-mitótico e pré-síntese do DNA.
GADD45	- Refere-se ao gene e à proteína de mesmo nome <i>Growth Arrest and DNA Damage 45</i> .

GHM-FIT	- Graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral.
HE	- Hematoxilina e eosina.
HBV	- Vírus da hepatite B humana.
HCV	- Vírus da hepatite C humana.
HPV	- Papilomavírus humano.
Hotspot	- Refere-se a uma determinada área do DNA que é especialmente propensa a sofrer mutações ou recombinações.
Intron	- Seqüência de bases do DNA, que interrompe as seqüências codificantes (exons) de um gene. As seqüências intrônicas são transcritas para RNA, porém são 'removidas' da mensagem antes que esta seja traduzida em proteína.
Kb	- Quilobase.
Kd	- Quilodalton – unidade de peso molecular.
Locus	- Posição no cromossomo ocupada por determinado gene.
LOH	- Do inglês <i>Loss of Heterozygosity</i> – Perda de Heterozigidade.
Mdm2	- Refere-se ao gene <i>murine double minute 2</i> , bem à proteína codificada por ele.
mM	- Milimolar - unidade de concentração.
Missense	- Mutação que altera um codon de um aminoácido em particular para um que especifica um aminoácido diferente.
Missplicing	- Mutação do tipo <i>splice site</i> .
NMU	- N-nitroso-N-metiluréia.
NNK	- 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona.
NNN	- Nitrosonorticotina.
Nonsense	- Mutação que leva uma cadeia polipeptídica a terminar prematuramente.
p21	- Nome dado a uma proteína do ciclo celular que possui peso molecular de 21 quilodaltons, pertencente à família das Cip (proteínas inibidoras de ciclina).
p53R2	- Refere-se a um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 8q23.1, que codifica uma proteína de mesmo nome que contem forte similaridade com a enzima ribonucleotídeo reductase subunidade pequena (R2).

PAHs	- Do inglês <i>Policyclic Aromatic Hydrocarbons</i> – Hidrocarbonos aromáticos policíclicos.
PCNA	- Refere-se ao gene <i>proliferating cell nuclear antigen</i> , localizado no cromossomo 20p12; este gene codifica uma proteína de mesmo nome.
PCR	- Do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase.
pH	- Potencial hidrogeniônico.
Rb	- Refere-se ao gene do Retinoblastoma; denomina-se pRb a proteína codificada por ele.
S	- No ciclo celular, representa a fase de síntese do DNA.
Splicing Alternativo	- Processo em que há a utilização alternativa de exons gerando um grupo de proteínas relacionadas, geradas a partir de um único gene.
SSCP	- Do inglês <i>Single Stranded Conformational Polimorphism</i> – Polimorfismo Conformacional de Fita Única.
TGGE	- Do inglês <i>Temperature Gradient Gel Electrophoresis</i> – Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura.
TNM	- Sistema de estadiamento clínico de tumores, onde T representa tumor primário, N representa linfonodos regionais e M representa metástase à distância. Do inglês <i>tumour node metastasis</i> .
TRIS-HCl	- Tris-hidroxi-metil-aminometano/Ácido clorídrico.
TUNEL	- Do inglês <i>Terminal dUTP nick-end-labelling</i> .
Upstream	- Refere-se aos eventos iniciais de qualquer processo que envolva reações seqüenciais.
UV	- Ultravioleta.
Waf-1	- Refere-se ao gene <i>wild type p53 activated fragment one</i> .

RESUMO

O papel das alterações do gene supressor de tumor *TP53* e de seu produto protéico, a p53, já está bem estabelecido no processo de carcinogênese bucal. O carcinoma epidermóide é a malignidade intrabucal mais comum, sendo a língua o sítio de acometimento mais freqüente e o de pior prognóstico. Avaliou-se, nesse estudo, comparativamente, através de técnica imunistoquímica utilizando-se o clone DO-1, o padrão de imunomarcção para a p53 em 43 amostras teciduais de carcinomas epidermóides da cavidade bucal de sítios anatômicos diferentes. A média de idade dos pacientes foi de 58,6 anos, sendo que 35 (81,4%) eram do sexo masculino e 8 do sexo feminino (18,6%). Trinta e três lesões (76,8%) mostraram positividade para a p53 e 10 lesões foram p53-negativas (23,2%). O índice médio de imunomarcção foi de 48,37%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos índices de imunomarcção para a p53 nos diferentes sítios analisados. Da mesma forma, não houve diferença quando comparadas as lesões de língua com os outros sítios anatômicos, agrupados ou isoladamente. Igualmente, a imunomarcção para a p53 nas lesões não esteve associada às outras variáveis clinicopatológicas avaliadas: sexo, idade e graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral (GHM-FIT). Das 41/43 lesões disponíveis para análise da GHM-FIT, 14 (34,15%) mostraram-se bem diferenciadas, 17 (41,46%) moderadamente, e 10 (24,39%) pouco diferenciadas. A imunomarcção para a p53 foi vista em 11/14 (78,6%) das lesões bem diferenciadas, em 15/17 (88,2%) das moderadamente diferenciadas, e em 6/10 (60%) das pouco diferenciadas. Esses resultados sugerem a não existência de diferenças entre os diversos sítios anatômicos da boca, bem como entre sexo e idade dos pacientes, em relação aos mecanismos que envolvem a p53. Assim, o padrão de imunomarcção da p53 nos carcinomas epidermóides de língua parece não refletir a maior agressividade do tumor neste sítio anatômico em particular. Uma relação direta entre a imunomarcção da p53 no tumor e o grau de diferenciação celular no fronte de invasão tumoral também não pôde ser estabelecida.

SUMMARY

The role of *TP53* tumor suppressor gene alterations and its product, p53 protein, has been well established in oral carcinogenesis process. Squamous cell carcinoma is the most common malignancy of the oral cavity, the tongue being the most frequent affected site. It was investigated, by means of immunohistochemistry using DO-1 monoclonal antibody, p53 protein expression in 43 tissue samples of oral squamous cell carcinomas from different anatomical sites. Patients' mean age was 58,6 years, being 35 (81,4%) male and 8 (18,6%) female patients. Thirty-three lesions (76,8%) showed positivity for p53 and 10 lesions were p53-negatives (23,2%). p53 expression mean index was 48,37%. No statistically significant differences between p53 expression mean indexes and the different anatomical sites analysed were found. Similarly, no differences were found when comparing tongue lesions with the other anatomical sites, grouped or singly. Equally, p53 expression was not associated to the other clinicopathological variables studied: sex, age and histological malignancy grading of the invasive tumor front (HMG-ITF). Of 41/43 lesions available for assessing HMG-ITF, 14 (34,15%) were well differentiated, 17 (41,46%) moderately, and 10 (24,39%) were poorly differentiated lesions. p53 expression was seen in 11/14 (78,6%) well differentiated lesions, in 15/17 (88,2%) moderately differentiated lesions, and in 6/10 (60%) of poorly differentiated lesions. These results suggest that it might not exist any differences between oral cavity different anatomical sites, as well as sex and age of patients, in relation to p53 mechanisms. Moreover, p53 expression in squamous cell carcinomas of the tongue does not reflect the higher tumor aggressiveness reported in this anatomical site. A direct relationship between p53 expression and cellular differentiation grade could not be established as well.

1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os dados epidemiológicos sobre câncer apontam o câncer bucal como o décimo terceiro em prevalência na população feminina e o oitavo na população masculina mundial (França, 2003), sendo representado, em mais de 90% dos casos, pelo carcinoma epidermóide.

Os fatores etiológicos, atuando em um indivíduo geneticamente susceptível, incluem o uso de tabaco, uso de betel, consumo de álcool, dieta pobre em frutas e vegetais frescos, agentes infecciosos, deficiência imune e, no caso do carcinoma de lábio, exposição à luz solar. Esses estímulos carcinogênicos são mutagenes que têm a capacidade de alterar a estrutura de genes e cromossomos pela produção de alterações genéticas que resultam em anormalidades na expressão de genes e na função bioquímica dos seus produtos proteicos.

A maioria dos diagnósticos ainda são feitos nos estágios mais avançados da doença, implicando em um baixo índice de sobrevida em cinco anos, sendo que os tumores de língua, além de serem os mais freqüentes, mostram os piores índices (Wüncch-Filho, 2002).

Dois fatores, que talvez possam explicar os prognósticos significativamente piores no carcinoma epidermóide de língua, são o seu alto potencial para invasividade local e uma grande propensão para metástase nos linfonodos cervicais, o que afeta sobremaneira a possibilidade de controle regional e a sobrevida.

De acordo com a literatura, parecem existir diferenças na metabolização dos carcinógenos nos diferentes tecidos, razão pela qual um mesmo carcinógeno pode ser mais

mutagênico em um tecido do que em outros. A resposta para essas diferenças parece estar na presença e quantidade das enzimas responsáveis pela ativação metabólica de um determinado carcinógeno. Estudos experimentais realizados com o 4NQO (4-nitroquinolina-1-óxido) em camundongos (Von Pressentin et al., 1999), mostraram maior mutagenicidade desse carcinógeno no tecido lingual do que em outros sítios da cavidade bucal, segundo os autores, pela maior quantidade de reductases existentes na língua.

Em diversos tipos de neoplasias humanas, talvez até na maioria delas, um achado comum é a mutação de substituição de bases no gene supressor de tumor *TP53*. Além da mutação, outras alterações no gene e no seu produto proteico, já foram exaustivamente documentadas na literatura. Atualmente, o foco das pesquisas sobre o *TP53* tem sido direcionado para o possível papel do gene e da proteína p53 como marcadores moleculares do câncer, e até mesmo a sua utilização na terapia contra a doença. Nos carcinomas epidermóides da cavidade bucal, assim como nas lesões bucais com potencial de transformação maligna, as alterações do gene e da proteína p53 confirmam a sua importância também no processo de carcinogênese bucal.

Assim, justifica-se o estudo comparativo do padrão de marcação imunoistoquímica da proteína p53 nos carcinomas epidermóides de língua, em comparação aos carcinomas epidermóides de outros sítios anatômicos da boca.

2

Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide de boca

A malignidade intrabucal mais comum é representada pelo carcinoma epidermóide, que abrange cerca de 90% dos casos de câncer bucal (Zakrzewska, 1999; Scully & Porter, 2000).

O sítio anatômico mais acometido é a língua, compreendendo cerca de 40% dos casos, sendo a borda lateral posterior e a superfície ventral as regiões mais freqüentes de acometimento. O segundo sítio mais comum é o assoalho bucal e os menos freqüentes incluem rebordo alveolar, mucosa jugal, mucosa labial e palato duro (Scully & Porter, 2000; Neville & Day, 2002). Os carcinomas orofaríngeos surgem freqüentemente na porção lateral do palato mole e região tonsilar, mas podem também se originar da base da língua (Neville & Day, 2002).

Os índices de incidência e mortalidade colocam o câncer da cavidade bucal em oitavo e décimo terceiro lugares na população mundial masculina e feminina, respectivamente (Parkin et al., 1999; França, 2003). No Brasil, excluindo-se o câncer de pele, o câncer de boca e faringe representa o quinto em incidência entre os homens e o sétimo entre as mulheres (Wünsch-Filho, 2002).

A mortalidade para o câncer bucal permanece alta e, embora o prognóstico para o câncer de lábio seja bom, o prognóstico para as lesões intrabucais permanece ruim (Zakrzewska, 1999). Na população mundial, estima-se em 46% a sobrevivência em 5 anos para o câncer de boca/orofaringe, embora este índice varie de acordo com a região geográfica (Parkin et al., 1999).

Existem boas evidências que o tabaco em todas as suas formas é carcinogênico no trato aerodigestivo superior, o que inclui a boca (La Vecchia et al., 1997; Zakrzewska, 1999; Ostwald et al., 2000; Scully & Porter, 2000; Hsieh et al., 2001; Cruz et al., 2002a; Pfeifer et al., 2002; Wünsch-Filho, 2002). O consumo de álcool também está implicado na etiologia do câncer bucal e parece atuar sinergisticamente com o tabaco (La Vecchia et al., 1997; Scully & Porter, 2000; Wünsch-Filho, 2002). Além desses, os outros fatores etiológicos envolvidos incluem fatores ocupacionais e ambientais (Wünsch-Filho, 2002), dieta (La Vecchia et al., 1997; Scully & Porter, 2000; Hsieh et al., 2001; Wünsch-Filho, 2002), agentes infecciosos como *Candida* e vírus (La Vecchia et al., 1997; Scully & Porter, 2000; Wünsch-Filho, 2002), deficiência imune e a luz solar, no caso do carcinoma de lábio (Scully & Porter, 2000).

O dano genético que produz uma perda de controle do crescimento da célula compreende um mecanismo fundamental da carcinogênese química. Grande parte dos carcinógenos químicos requer ativação metabólica para eletrófilos reativos que modificam macromoléculas celulares (ácidos nucleicos e proteína). A exposição à maioria dos carcinógenos químicos resulta em dano à integridade estrutural do DNA (ácido desoxiribonucleico), o qual ocorre primeiramente como ligação covalente do carcinógeno e é chamada de formação de aducto carcinógeno-DNA (Poirier et al., 2000).

Muitos conceitos foram desenvolvidos a respeito da significância das enzimas envolvidas no metabolismo dos carcinógenos e, atualmente, muito já se sabe sobre suas concentrações nos vários tecidos humanos e a extensão de sua variabilidade entre humanos. Estudos em animais foram realizados com a finalidade de investigar o papel dessas proteínas no processo de toxicidade e carcinogênese (Guengerich, 2000).

Culp et al. (1998) observaram, por dois anos, a tumorigenicidade do alcatrão de carvão (traduzido do inglês *coal tar*), rico em hidrocarbonos aromáticos policíclicos (PAHs) e

aminas aromáticas, e do benzopireno, em camundongos fêmeas B6C3F1. O benzopireno é um PAH sabidamente carcinogênico em tecidos de camundongos como pele (através de aplicação tópica), pulmão, fígado, baço, esôfago e língua (Kosinska et al., 1999). O tratamento com esse carcinógeno resultou em incidência aumentada de papilomas e carcinomas do antro cardíaco (porção torácica do esôfago), esôfago e língua. A administração dos carcinógenos foi feita através da alimentação.

O estudo de Kosinska et al. (1999) confirmou a ação carcinogênica do benzopireno na língua, em outros tecidos da cavidade bucal, e no tecido mamário de camundongos transgênicos fêmeas *lacZ* (MutaTM Mouse).

A maioria dos carcinomas epidermóides de boca ocorrem em indivíduos do sexo masculino (Guedes-Pinto, 2000; França, 2003), entre a quinta e oitava décadas de vida, sendo o tabaco o principal fator etiológico para este grupo de pacientes (Regezi et al, 1999). Entretanto, mais de 4% desses tumores ocorrem em pacientes com menos de 40 anos de idade (Sorensen et al., 1997). De forma semelhante, a ocorrência de câncer de cabeça e pescoço em pacientes não-fumantes tem sido alvo de investigações (Brennan et al., 1995a; Koch et al., 1999; Haas et al., 2002; Cruz et al., 2002a).

Apesar dos avanços no tratamento, os diagnósticos ainda são conduzidos nos estágios mais avançados da doença (Nagler, 2002). Em uma pesquisa realizada por Onizawa et al. (2003) em 152 pacientes, a duração total do processo de diagnóstico do carcinoma epidermóide bucal, desde a instalação do primeiro sinal ou sintoma associado ao câncer até a determinação definitiva do diagnóstico, variou de 0,4 a 63 meses, com tempo mediano de 2,7 meses. É crucial a atenção do profissional no exame clínico dos pacientes (Neville & Day, 2002). Algumas lesões ou condições que podem estar presentes na boca possuem potencial para se transformar em uma malignidade. Dentre elas, destacam-se as eritroplasias, as leucoplasias, líquen plano e fibrose submucosa (Scully & Porter, 2000).

As opções de tratamento para o carcinoma epidermóide da cavidade bucal variam e dependem do tamanho e localização do tumor primário, do envolvimento dos linfonodos, da presença ou ausência de metástases distantes, e da vontade e habilidade do paciente em realizar e suportar a terapia (Neville & Day, 2002). A cirurgia e a radioterapia compreendem o tratamento padrão para este tipo de lesão (Grau et al., 2002; Neville & Day, 2002). A quimioterapia geralmente é utilizada como neo-adjuvante, ou seja, anterior à cirurgia ou radioterapia (Zakrzewska, 1999; Grau et al., 2002; Neville & Day, 2002).

De acordo com Bryne et al. (1992), os métodos mais freqüentemente utilizados como fatores prognósticos para o carcinoma epidermóide da cavidade bucal são o estadiamento clínico pelo sistema TNM (do inglês, *Tumour Node Metastasis*) e a graduação histológica de malignidade. O sistema TNM permite a análise das principais características clínicas de um tumor: extensão local, disseminação regional e metástases distantes. Os sistemas de graduação histológica são igualmente importantes, visto que enfatizam as características histopatológicas e a relação imunológica tumor-hospedeiro.

Bryne et al. (1992) propuseram um sistema de graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral. Esse sistema, segundo os autores, oferece uma melhor associação prognóstica. O método baseia-se na observação das características das células neoplásicas (queratinização e pleomorfismo) - características estas diferentes daquelas presentes em outras áreas do tumor - e na relação entre essas células e o hospedeiro (padrão de invasão do tumor e intensidade do infiltrado inflamatório).

Segundo Bryne (1998), no fronte de invasão, o tumor apresenta com freqüência um menor grau de diferenciação e um maior grau de dissociação celular do que as áreas remanescentes do tumor. Além disso, eventos moleculares importantes para o desenvolvimento do processo de progressão tumoral ocorrem principalmente no fronte de invasão, como alterações em moléculas de adesão, secreção de enzimas proteolíticas,

aumento na proliferação celular e diminuição da apoptose. O autor ressalta algumas vantagens da gradação histológica do fronte de invasão: alto valor prognóstico, facilidade e rapidez de execução, e reprodutibilidade.

Sawair et al. (2003), avaliando 102 casos de carcinoma epidermóide da cavidade bucal, confirmaram o potencial valor prognóstico desse sistema de gradação. Entretanto, os autores notaram que diversos componentes do sistema exibiram concordância interobservador abaixo do que seria considerado como razoável.

Piffkó et al. (1998) investigaram uma possível relação entre a gradação histológica do fronte de invasão e a imunomarcação para a proteína p53, porém nenhuma correlação foi encontrada.

Horta (2003) analisou a imunomarcação das proteínas p53, p21 e Mdm2 (*Murine Double Minute 2*) em carcinomas epidermóides de lábio no epitélio adjacente à neoplasia, em toda a extensão da neoplasia e no fronte de invasão. Não foram encontradas correlações entre a gradação histológica do fronte de invasão e os índices de imunomarcação das proteínas estudadas.

De acordo com Costa et al. (2002), o sítio anatômico da lesão também deve ser considerado como indicador do prognóstico, visto que os tumores possuem comportamentos distintos dependendo da sua localização.

Entretanto, apesar da utilidade e aplicabilidade, muitos estudos apontam falhas nesses sistemas (Ünal et al., 1999; Costa et al., 2002; Gonzales-Moles et al., 2002a) e muitas investigações têm sido realizadas com finalidade de encontrar métodos mais eficazes para avaliação do prognóstico para os pacientes com este tipo de câncer. Assim, a espessura do tumor (Urist et al., 1987; Gluckman et al., 1997; Gonzales-Moles et al., 2002a)

e a profundidade e padrão de invasão (Urist et al., 1987; Bryne et al., 1992; Gluckman et al., 1997) surgiram como fatores de prognóstico adicionais. Além disso, alterações nas seqüências de genes, na estrutura, função e níveis de expressão de proteínas podem ser úteis como marcadores moleculares na detecção do câncer, na determinação do prognóstico, no monitoramento da progressão da doença e na resposta à terapia (Sidransky, 2002).

2.1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÍNGUA

O carcinoma epidermóide de língua é a malignidade intrabucal mais comum e é caracterizado por um prognóstico ruim (Nagler et al., 2002; Tsurusako et al., 2002) devido ao alto potencial para invasividade local e grande propensão a metastatizar para os linfonodos cervicais, o que afeta a probabilidade de controle regional e a sobrevida. O uso de tabaco e álcool são os fatores de risco mais importantes envolvidos na etiologia da doença (Bova et al., 1999; Xie et al., 1999; O-charoenrat et al., 2003).

Importantes dados de um estudo (Nagler et al., 2002) sobre as características e prevalências do carcinoma epidermóide da cavidade bucal mostram que 37,7% das lesões estavam localizadas na língua, enquanto que as restantes encontravam-se distribuídas em menores proporções no lábio (20,7%), mandíbula (14,1%), maxila-palato (9,4%), mucosa bucal (6,6%), assoalho bucal (5,6%) e região peribucal (5,6%). Além disso, o carcinoma epidermóide compreendeu 93% das malignidades bucais tratadas, enquanto que o carcinoma mucoepidermóide e o adenocarcinoma somaram 2% cada, e o linfoma maligno, neurofibrossarcoma e leiomiossarcoma, 1% cada. A idade média e mediana dos pacientes foi, respectivamente, 63,4 e 67 anos. Em 64% dos pacientes o carcinoma surgiu sem etiologia conhecida, enquanto que em 14% havia uma lesão pré-maligna (eritroleucoplasia, leucoplasia ou líquen plano), biopsiada e monitorada por mais de 10 anos antes do

diagnóstico definitivo de carcinoma. Os tumores que surgiram na parte móvel da língua demonstraram melhor prognóstico do que aqueles localizados na base.

O controle do tumor primário geralmente é feito por meio de cirurgia ou terapia de radiação (O-charoenrat et al., 2003). Embora a ampla excisão local dos tumores de língua seja usualmente possível, o índice de recorrência é maior do que nos tumores faríngeos e laringeos (Ünal et al., 1999). O índice de mortalidade em 5 anos alcança aproximadamente 50%. Este baixo índice de sobrevida não mudou significativamente nos últimos anos, apesar do progresso feito nas áreas de imagem, diagnóstico, cirurgia, radioterapia e quimioterapia adjuvante. Além disso, os pacientes que sobrevivem sofrem de extremo desconforto, já que o tratamento resulta com frequência em mutilação e comprometimento da fala, paladar, mastigação e deglutição (Nagler et al., 2002).

É provável que a presença de metástases na região cervical seja o fator prognóstico mais importante, tanto no câncer de língua quanto no de assoalho bucal. Devido à abundância de vasos linfáticos nesses dois sítios anatômicos, 35% dos cânceres dessas regiões já se espalharam para os linfonodos cervicais por ocasião do diagnóstico (Atula et al., 1996; Dias et al., 2001). Segundo Dias et al. (2001), se a doença regional metastática está presente na avaliação inicial de um paciente com câncer de boca, independente do sítio anatômico, ou se desenvolve subsequente à terapia primária, o índice de sobrevida em 5 anos pode cair para índices inferiores a 20%. Por essas razões, o tratamento de eleição para os linfonodos cervicais nos casos de carcinoma epidermóide de língua permanece controverso, especialmente nos casos de tumores iniciais (T1, T2) onde os linfonodos se mostram clinicamente negativos (O-charoenrat et al., 2003).

O exame clínico dos linfonodos cervicais, método mais comum para estadiamento do pescoço, é impreciso e não identifica as micrometástases linfáticas. Ele possui sensibilidade e especificidade em torno de 60-70%, e a falta de métodos não-

invasivos precisos para a sua avaliação, são importantes fatores a serem considerados. A recomendação de tratamento eletivo do pescoço, esvaziamento cervical ou política de espera-observação, no carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal em estágio I, é controversa. A ampla variação no percentual de metástases ocultas, de 6% a 46%, encontrada neste grupo em particular, e os baixos índices de sobrevivência, inferiores a 40%, são as principais razões para essa controvérsia (Dias et al., 2001). Hogmo et al. (1999) encontraram índices de recorrência local e regional na ordem de 16% e 27%, respectivamente, para carcinomas epidermóides de língua em estágio I.

Dias et al. (2001) comparando os resultados de tratamento cirúrgico, com e sem esvaziamento cervical, em carcinomas epidermóides de língua e assoalho bucal (T1N0M0), observaram que de sete pacientes que apresentaram recorrência regional, seis haviam sido tratados somente com a cirurgia, sem esvaziamento. A incidência de recorrência regional mostrou valores de 4% e 24% para os grupos com e sem esvaziamento cervical, respectivamente.

O-charoenrat et al. (2003) avaliaram 50 pacientes com carcinomas epidermóides de língua, primários e não tratados. Características clínicopatológicas como idade, gênero, consumo de tabaco e álcool, local do tumor, grau histológico, borda tumor-estroma, padrão de crescimento, espessura do tumor e estágio clínico, foram avaliadas e as correlações com metástases cervicais e os efeitos nos pacientes foram determinados. A espessura tumoral excedendo 5 milímetros (mm) estava significativamente correlacionada com a metástase cervical. A sobrevida doença-específica (DSS, do inglês *Disease Specific Survival*), calculada a partir da data do diagnóstico até o último acompanhamento ou morte por câncer de língua, mostrou os piores resultados para os pacientes com mais de 60 anos e com espessura tumoral superior a 5mm.

Nagler et al. (2002) avaliaram as características clínicas e os índices de probabilidade de sobrevida, de 116 pacientes tratados para carcinoma epidermóide de língua. A probabilidade geral de sobrevida em 5 anos foi de 55%, valor que, segundo os autores, provavelmente é resultado da baixa incidência de consumo de tabaco e álcool entre os pacientes (21%), do diagnóstico precoce (65% nos estágios I e II) e do baixo grau histológico dos tumores (91% bem e moderadamente diferenciados). O tratamento radioterapêutico ou cirúrgico do pescoço não alterou a probabilidade de sobrevida alcançada pela cirurgia local nos pacientes em estágio I, mas melhorou, significativamente, a sobrevida para os pacientes em estágio II. A presença de metástases em linfonodos foi o mais confiável e importante fator de prognóstico da sobrevida em 5 anos dos pacientes.

Alguns estudos experimentais em camundongos (Culp et al., 1998; Kosinska et al., 1999; Von Pressentin et al., 1999; Schwartz et al., 2000) procuraram verificar os efeitos dos carcinógenos químicos no tecido lingual. Embora os camundongos sejam pequenos animais, com um alto índice metabólico e um curto período de vida, eles desenvolvem tumores nos mesmos tecidos e, na maioria das vezes, com um curso histopatológico bastante similar ao observado nos tecidos humanos (Balmain & Harris, 2000). Porém, o protocolo de tratamento com o carcinógeno, a cepa e o sexo do animal, podem influenciar nos resultados (Kosinska et al., 1999).

Em um estudo realizado por Von Pressentin et al. (1999), em camundongos *lacZ* (MutaTM Mouse), os autores observaram que os carcinógenos 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO), benzopireno (B[a]P), N-nitroso-N-metiluréia (NMU), 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), nitrosonorticotina (NNN) e 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA), foram mutagênicos em uma mistura de tecidos bucais reunidos (gengival, jugal, faringeano e sublingual) e na língua. Todos os agentes, exceto o DMBA, que foi aplicado topicamente na cavidade bucal, e o B[a]P por alimentação, foram administrados na água de beber por 2-4 semanas. Observou-se que os carcinógenos foram mutagênicos na cavidade bucal dos

animais e os valores para a mutagênese induzida na língua foram similares, exceto para o 4NQO, que foi duas vezes mais potente nesse sítio anatômico. Os autores concluíram que a cavidade bucal tem uma capacidade significativa para ativação metabólica de carcinógenos, e a língua, em especial, é um tecido rico em reductases, que são enzimas responsáveis pela ativação metabólica do 4NQO.

Como foi citado por Ünal et al. (1999), Dias et al. (2001) e Gonzales-Moles et al. (2002a), na prática clínica, o planejamento do tratamento e a predição do prognóstico para os pacientes com carcinoma epidermóide da língua, são baseados principalmente na classificação TNM. Este sistema, entretanto, não prediz o curso clínico dos pacientes individualmente e não dá nenhuma informação no que diz respeito às características biológicas de um tumor. Assim, é importante buscar novos fatores prognósticos que sejam mais objetivos e que possam adicionar informações sobre a agressividade dos tumores (Atula et al., 1996; Xie et al., 1999). Segundo Nagler et al. (2002), é necessária a identificação dos fatores biológicos indicativos desta agressividade, especialmente se as características biológicas desses tumores são variáveis, mesmo quando seu estágio é idêntico.

2.2 p53

Apesar do progresso em diagnóstico e terapêutica na oncologia durante as décadas passadas, o prognóstico do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, incluindo o intrabucal, permanece ruim. O carcinoma epidermóide abrange mais de 90% das lesões malignas da boca, tem um baixo índice de sobrevivência em 5 anos (menos de 50%) e que não tem melhorado nas duas últimas décadas. A incidência anual de câncer bucal excede 300.000 novos casos. Assim, parece ser de suma importância encontrar um marcador ou marcadores biológicos tumorais que elevem os índices de diagnóstico precoce e de monitoramento do tratamento, a fim de melhorar o prognóstico para este tipo de câncer (Nagler, 2002).

Os genes supressores tumorais, categoria a qual pertence o *TP53*, encontram-se frequentemente alterados em diversos tipos de câncer, incluindo o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, e têm sido considerados como marcadores moleculares (Nagler, 2002).

O gene *TP53* humano compreende aproximadamente 20 Kb (quilobases) do DNA, é composto por 11 exons e está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13) (May & May, 1999; Liao et al., 2000). Este gene codifica uma fosfoproteína nuclear de mesmo nome, com peso molecular de 53 Kd (quilodaltons) e composta por 393 aminoácidos (May & May, 1999; Nylander et al., 2000; Bullock & Fersht, 2001).

Van Oijen & Slootweg (2000b), em uma revisão sobre a teoria do campo de cancerização no trato aerodigestivo superior, acreditam que para ser qualificada como marcador, a alteração genética deveria: (a) ocorrer muito precocemente no desenvolvimento

da lesão primária; (b) manter-se durante a progressão da lesão; (c) exibir suficiente variabilidade, e; (d) ser aplicável na maioria das lesões.

Alguns critérios determinam a confiabilidade de um marcador molecular. Primeiramente, ele deve ser específico para as células tumorais de forma que ele faça a distinção correta entre estas e as células normais. Segundo, para classificá-lo como “clonal”, a alteração genética deve preceder ou ocorrer durante o estágio de câncer invasivo e manter-se estável durante a progressão tumoral. Terceiro, ele deve ser amplamente aplicável, ou seja, deve estar presente em grande parte da população de estudo (Van Houten et al., 2000).

Baseando-se nesses critérios, Van Houten et al. (2000) acreditam que as mutações do gene *TP53* no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço parecem ser marcadores tumores-específicos adequados, já que ocorrem antes da formação de metástase em linfonodos. Segundo os autores, os principais pontos negativos são a frequência dessas mutações, que é de aproximadamente 50-60%, o que contraria o terceiro critério para elegê-las como marcador confiável, e a heterogeneidade das mutações, o que torna mais difícil projetar técnicas simples para detecção das células tumorais.

Para Kropveld et al. (1999), a frequência de mutações do *TP53* no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço de aproximadamente 60% é um ponto positivo para sua utilização como marcador molecular. Além disso, o *TP53* é um gene relativamente pequeno tornando possível, portanto, a sua análise seqüencial sem muito esforço, e as suas mutações ocorrem de forma dispersa por todo o gene, embora sejam mais frequentes em alguns codons.

As mutações do gene *TP53* estão entre os marcadores genéticos já utilizados na avaliação da relação clonal entre lesões escamosas independentes no trato aerodigestivo.

No carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, essas mutações são consideradas bastante úteis como marcador por serem um evento precoce no seu desenvolvimento, visto que estão presentes no tecido normal distante dos tumores, no tecido normal de fumantes saudáveis e em lesões pré-malignas; por serem suficientemente diversas; e serem estáveis durante a metastatização (Van Oijen & Slootweg, 2000b).

A análise da mutação genética é útil não somente na detecção do câncer nos pacientes, mas também no monitoramento da disseminação da doença e no prognóstico (Van Houten et al., 2000; Sidransky, 2002). Em 1995, foi relatado pela primeira vez que as mutações do gene *TP53* poderiam ser usadas para acompanhar a disseminação do tumor nas margens e nos linfonodos de pacientes com câncer de cabeça e pescoço (Brennan et al., 1995b). No estudo, entre os espécimes tidos inicialmente como não-comprometidos na avaliação histopatológica, uma porcentagem substancial de margens cirúrgicas e linfonodos continha mutações do *TP53* específicas para o tumor primário. Os pacientes com margens positivas tiveram maior risco de recorrência local. Para os autores, o reconhecimento molecular de células tumorais em tecidos aparentemente livres de tumor, pode identificar pacientes que se beneficiariam com a re-operação ou radioterapia (Brennan et al., 1995b).

Embora milhares de estudos sejam publicados a cada ano descrevendo mutações genéticas ou alterações nos níveis de expressão de proteínas que estão associados com vários tipos de câncer, poucos destes são desenvolvidos para marcadores moleculares que possam ser rotineiramente utilizados no cenário clínico. Alguns marcadores moleculares são usados em combinação com outras técnicas, como estudos histológicos e de imagem, para detectar, diagnosticar e monitorar o câncer (Sidransky, 2002).

Desde sua descoberta, em 1979, foram necessários mais dez anos de pesquisas para reconhecer o gene *TP53* como um supressor de tumor (Bullock & Fersht, 2001). A primeira evidência que sugeriu que ele pode freqüentemente ser inativado em cânceres

humanos foi obtida de estudos demonstrando que a perda de heterozigosidade do cromossomo 17p, onde se localiza o gene *TP53*, era comum em certos tipos de tumores, incluindo o pulmonar, de mama, de bexiga e coloretal. A análise da seqüência dos alelos do *TP53* mantidos nos cânceres com perda de heterozigosidade do 17p, demonstrou que o alelo remanescente do *TP53* estava mutado na grande maioria dos casos (Baker et al., 1990).

Baseado nos tipos de tumores nos quais as mutações do *TP53* foram encontradas e na prevalência de mutações do gene nesses diversos tipos tumorais, acredita-se que o *TP53* esteja entre os genes mais freqüentemente mutados no câncer humano e as suas alterações sugerem que ele desempenhe um papel fundamental também na progressão do tumor (Fearon & Vogelstein, 2000; Oda et al., 2000). As alterações do *TP53* também se encontram bastante correlacionadas ao processo de carcinogênese bucal (Crosthwaite et al., 1996; Kropveld et al., 1999; Ostwald et al., 2000; Shahnava et al., 2000; Gonzales-Moles et al., 2002b).

O *TP53* tem sido conservado durante a evolução. O sequenciamento do gene em mamíferos, anfíbios, pássaros e peixes revelou cinco regiões altamente conservadas entre as espécies e chamadas de Domínios. Os Domínios que se localizam na porção central da proteína, englobando os exons 5 a 8, são regiões consideradas como *hotspots* para mutações (Hollstein et al., 1991; Walker et al., 1999; May & May, 1999; Nylander et al., 2000).

Com base no conhecimento da estrutura da proteína p53, duas classes de mutações podem ocorrer: as de Classe I ou de contato e as de Classe II ou estruturais. As mutações de Classe I afetam resíduos que contatam diretamente o DNA. Isto inclui os resíduos que são considerados *hotspots* para mutações no *TP53*. As mutações de Classe II afetam resíduos que não contatam diretamente o DNA, mas que fazem contatos extensos

com outros resíduos no polipeptídeo e têm um forte efeito estabilizante sobre a estrutura da proteína. (May & May, 1999; Bullock & Fersht, 2001).

Como já esperado, a maioria dos *hotspots* de maior significância estatística e alta conservação evolucionária estão próximos da interface DNA-proteína, tanto nos aminoácidos que contatam o DNA quanto nos que não fazem contato direto com o DNA (Walker et al., 1999). As mutações nesses *hotspots* principais abrangem cerca de 30% de todas as mutações de *TP53* conhecidas (Szymańska & Hainaut, 2003).

Alguns estudos sugeriram que diferentes tipos de mutação dentro do domínio central do *TP53*, ou seja, as mutações de contato e as mutações estruturais, conferem diferentes propriedades biológicas aos tumores (Erber et al., 1998; Yamazaki et al., 2003). Erber et al. (1998) analisaram 86 carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e observaram que, em comparação com as mutações estruturais ou com a ausência de mutações no domínio central, as mutações de contato estavam associadas com estágios tumorais mais avançados, maior incidência de metástases em linfonodos, e tempo livre de recorrência e de sobrevida mais curtos.

Yamazaki et al. (2003) encontraram uma frequência de mutação de 42% em carcinomas epidermóides primários da cavidade bucal. As mutações não estavam associadas com nenhum dos parâmetros clinicopatológicos analisados. Entretanto, os tumores que continham mutações específicas do *TP53*, isto é, nas regiões da superfície de ligação ao DNA e nas regiões conservadas, tiveram prognósticos significativamente piores do que os tumores com mutações fora dessas regiões. Além disso, a metástase em linfonodos e a ocorrência de subseqüentes metástases à distância também estavam significativamente associadas com mutações dentro das regiões da superfície de ligação ao DNA.

Segundo Nylander et al. (2000), as alterações genéticas e proteicas do *TP53* como marcadores do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço são apenas um fator a mais em um painel de fatores com importância para o resultado clínico e que também devem ser levados em consideração. Entretanto, à medida que as técnicas forem se tornando mais sensíveis e quantitativas, a avaliação completa e minuciosa do paciente com câncer deverá ser baseada somente nos marcadores moleculares (Sidransky, 2002).

2.2.1 p53 E O CICLO CELULAR

O ciclo celular é um processo altamente ordenado que resulta na duplicação e transmissão da informação genética de uma geração celular para a próxima. Durante o processo, o DNA deve ser acuradamente duplicado e cópias cromossômicas idênticas são distribuídas entre duas células filhas (Israels & Israels, 2000). Este processo é cuidadosamente regulado e responde às necessidades específicas de um certo tecido ou tipo de célula. Normalmente, no tecido adulto, existe um delicado equilíbrio entre a morte da célula (morte celular programada ou apoptose) e a proliferação (divisão celular) produzindo um estado estável. A ruptura deste equilíbrio por perda de controle do ciclo celular pode levar, eventualmente, ao desenvolvimento tumoral (Sandal, 2002).

A proliferação celular descontrolada é uma das características principais do câncer, e as células tumorais sofrem danos nos genes que estão diretamente envolvidos na regulação do ciclo celular. O dano é causado por mutações que produzem um oncogene com um ganho de função dominante, ou por mutações em genes supressores tumorais causando uma perda de função recessiva. Independente do dano genético ou do tipo de câncer, a característica comum é o ciclo celular rompido (Sandal, 2002).

O primeiro ponto de checagem que regula a divisão celular é denominado “ponto de restrição” ou “ponto R”. Este termo foi criado em 1974, por Arthur Pardee, para definir um

evento específico em G1, após o qual as células em cultura conseguiam proliferar independentemente de estímulos mitogênicos (Williams, 2000).

Postulou-se que a perda de regulação deste ponto R é crítica para o câncer. O ponto R normalmente impede as células de entrarem no ciclo até que elas tenham acumulado um certo limiar de eventos mitogêno-induzidos. Assim, a perda de controle neste ponto, devido a mutações em reguladores de G1 ou outros genes, permitiriam que as células entrassem no ciclo mesmo na ausência de sinalização mitogênica adequada, levando a uma proliferação não-programada (Malumbres & Barbacid, 2001).

Alterações no ponto de restrição podem causar instabilidade genômica (Williams, 2000; Sandal, 2002), acúmulo de dano no DNA, proliferação celular descontrolada e, eventualmente, tumorigênese (Sandal, 2002).

A expressão da proteína p53 pode causar uma inibição no crescimento da célula por impedir a sua progressão da fase G1 para a fase S do ciclo. Anormalidades neste ponto de checagem parecem ser o resultado de qualquer mecanismo que leve à função anormal da p53, incluindo perda da expressão da proteína, superexpressão dos produtos do gene *TP53* mutante ou interferência na função da proteína p53 por certos produtos de oncogenes virais (Chen et al., 1994).

A p53 normal, também chamada de p53 selvagem, é uma fosfoproteína nuclear que, em condições fisiológicas, possui meia-vida curta (20 minutos), presumivelmente devido à proteólise mediada pela ubiquitina. Por conseguinte, a p53 não controla o ciclo celular normal (Cotram et al., 2000). Na ausência de dano genético, a atividade transcricional da p53 permanece inerte (Alarcon-Vargas & Ronai, 2002).

A função da p53 na regulação do crescimento e da divisão das células, ocorre comumente como controle normal do crescimento da célula após estimulação por fator de crescimento (Szymańska & Hainaut, 2003) ou em resposta ao dano no DNA (Freedman & Levine, 1999; Szymańska & Hainaut, 2003). Na presença de lesão ao material genético, ocorrem diversas alterações na p53 aparentemente quiescente. Há um rápido aumento nos níveis da p53 e sua ativação como fator de transcrição (Cotram et al., 2000; Alarcon-Vargas & Ronai, 2002; Szymańska & Hainaut, 2003). Os mecanismos pelos quais a p53 controla o destino das células que sofrem dano no DNA ainda não foram completamente entendidos, porém diversas etapas dessa via já foram esclarecidas (Freedman & Levine, 1999).

O tipo selvagem da p53 acumulado liga-se ao DNA e estimula a transcrição de vários genes que atuam como mediadores dos dois principais efeitos da p53: parada do ciclo celular e apoptose (Cotram et al., 2000; Szymańska & Hainaut, 2003). Segundo Alarcon-Vargas & Ronai (2002), dependendo das condições de crescimento da célula, do tipo e duração do estresse ou dano no DNA, a p53 ativa seletivamente um subsistema de genes alvos que podem causar tanto apoptose, parada do crescimento, reparo do DNA alterado, ou diferenciação alterada.

A pausa no ciclo celular permite que a célula tenha tempo suficiente para reparar a lesão no DNA causada pelo agente mutagênico. A p53 também ajuda diretamente nesse processo ao induzir a transcrição de GADD45 (*Growth Arrest and DNA Damage*), proteína envolvida no reparo do DNA (Cotram et al., 2000). Os genes p53R2 e PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) também desempenham papéis no reparo do DNA (Qian et al., 2002).

Se o reparo for bem sucedido, a p53 ativa o gene Mdm2, cujo produto se liga a p53 promovendo a degradação desta última e, como consequência, há a liberação do bloqueio do ciclo celular (Freedman & Levine, 1999). Se o reparo ao DNA danificado não for

bem sucedido, a p53 induz então a ativação de genes responsáveis pela apoptose (Alarcon-Vargas & Ronai, 2002; Qian et al., 2002).

De acordo com Vousden (2002), as alterações na estrutura, função e expressão das proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular são eventos de particular importância no desenvolvimento e progressão do câncer de cabeça e pescoço.

2.2.2 p53: FUNÇÃO, ATIVAÇÃO, DEGRADAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO

A proteína p53 é um potente inibidor do crescimento celular, parando o ciclo celular em diversos pontos e, sob algumas circunstâncias, ativando o mecanismo apoptótico que leva à morte celular. Estas múltiplas funções da p53 são de importância crítica para a supressão tumoral, e a sua perda aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de malignidades (Ashcroft & Vousden, 1999).

Além da parada do ciclo celular e apoptose, a proteína p53 também está envolvida em outros processos celulares como reparo no DNA, recombinação, diferenciação celular (Michael & Oren, 2003), senescência (De Vries et al., 2002; Michael & Oren, 2003) e angiogênese (May & May, 1999). Os mecanismos que mantêm essas atividades da p53 sob rigoroso controle durante o crescimento normal da célula são igualmente importantes. Dentre esses mecanismos, o controle da estabilidade da proteína parece ser o principal (Ashcroft & Vousden, 1999).

Os principais mecanismos de controle da função da p53 são: regulação dos níveis da proteína p53, controle da localização da proteína e modulação da sua atividade, particularmente sua habilidade em atuar como fator de transcrição específico. A interação da proteína p53 com outras proteínas celulares contribui para a estabilidade, localização e atividade da p53 (Vousden, 2002).

Nas células normais, a p53 está presente em níveis extremamente baixos porque ela é rapidamente degradada após a sua síntese (Ashcroft & Vousden, 1999; Michael & Oren, 2003; Szymańska & Hainaut, 2003). Portanto, a proteína p53 tem uma meia-vida bastante curta, mas ela pode permanecer mais tempo no tecido por certas razões como mutação no *TP53*, defeito na sua via de degradação, ou por ligação a outras proteínas celulares ou virais (Nylander et al., 2000).

A proteína p53 é capaz de detectar diferentes tipos de estresse aos quais as células podem ser expostas (Nylander et al., 2000), tais como dano ao DNA, aberrações cromossômicas, erosão de telômero, ativação de oncogene e hipóxia (Michael & Oren, 2003). Ela gerencia a resposta a esses sinais de estresse pela indução de parada do crescimento celular, senescência ou apoptose. A natureza e intensidade do sinal de estresse, o tipo da célula e o contexto celular ditam o resultado final (Haupt et al., 2002).

A habilidade da p53 em induzir parada do ciclo e apoptose parece compreender funções separadas, independentes entre si (Vousden, 2002). Segundo Qian et al. (2002), ainda não está esclarecido por que algumas células respondem à ativação de p53 com parada do ciclo celular, enquanto outras sofrem apoptose. O tipo da célula, a quantidade de dano ao DNA, a presença de fatores de sobrevivência e a atividade inapropriada de oncogenes, parecem ser importantes fatores influenciadores.

Uma vez ativada, após exposição ao estresse, a proteína p53 mobiliza uma defesa na qual ela mesma atua como condutor, através da ativação de outros genes, a fim de produzir as proteínas necessárias ao processo de defesa (Nylander et al., 2000).

Atualmente, pelo menos três vias geneticamente distintas são conhecidas para a ativação do gene *TP53* (vias *upstream*): estímulo oncogênico através da via ARF; irradiação UV (ultravioleta) e radiação ionizante através da via ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), e;

outros estímulos como hipóxia, citocinas e fatores de crescimento (Nylander et al., 2000; Haupt et al., 2002). Os diferentes estímulos ativam a proteína p53 através de vias diferentes, de forma que a p53 resultante de dano ao DNA é ativada através de fosforilação e acetilação, enquanto que a p53 resultante de estímulos oncogênicos é salva da degradação (Nylander et al., 2000).

Na maioria das vezes, a proteína p53 selvagem é nuclear quando em estado ativo, porém uma fração substancial da proteína pode residir no citoplasma na ausência de sinais que a ativem e, portanto, ela possui uma meia-vida muito curta devido à rápida degradação proteossomal no citoplasma (Michael & Oren, 2003). Existem mecanismos específicos que controlam essa exportação da p53 do núcleo para o citoplasma (Vousden, 2002).

Após um dano ao DNA, a proteína p53 acumula (estabiliza) rapidamente e se torna ativada. Tanto a estabilização quanto a ativação da p53 envolvem uma variedade de mecanismos moleculares que incluem fosforilação, acetilação, glicosilação, ligação a proteínas regulatórias e *splicing alternativo* (May & May, 1999).

2.2.3 p53 E O CÂNCER

Os primeiros estudos conduzidos em modelos animais e inspirados na análise patológica dos neoplasmas humanos confirmaram que o desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplos estágios nos quais a somatória de eventos é necessária para produzir um tumor maligno. A introdução dos modelos *in vitro* ampliou o entendimento desses eventos celulares necessários ao processo de carcinogênese (Yuspa, 2000).

A probabilidade de um indivíduo desenvolver um câncer está relacionada tanto com o nível de exposição a carcinógenos exógenos, quanto com a base genética daquele

indivíduo (Balmain & Harris, 2000). De acordo com Hainaut et al. (1998), além dos carcinógenos exógenos, químicos e físicos, alguns processos endógenos, como metilação e deaminação da citosina nos resíduos CpG, injúria por radicais livres gerados por processos biológicos e erros na síntese e reparo do DNA, também podem gerar mutações.

Certas famílias com propensão ao câncer carregam mutações germinativas que facilitam o desenvolvimento do câncer em uma idade precoce, independente da presença ou ausência de exposição a carcinógeno. Muitos eventos biológicos críticos para tumorigênese podem ocorrer espontaneamente, particularmente depois que as alterações genéticas precoces tenham diminuído o controle geral da expressão de genes ou a estabilidade genômica, e pode-se supor, seguramente, que os polimorfismos nos genes que controlam muitos aspectos da progressão tumoral, incluindo índice de crescimento celular, migração e habilidade em induzir angiogênese, contribuem para a susceptibilidade (Balmain & Harris, 2000).

A influência dos fatores ambientais na carcinogênese é fortemente sustentada pelos estudos experimentais e epidemiológicos. O fato de que apenas uma pequena fração dos cânceres é atribuída às mutações germinativas em genes relacionados ao câncer, fortalece mais ainda a importância dos fatores ambientais na carcinogênese. Além disso, a penetrância das mutações germinativas pode ser modificada pelos fatores ambientais ou por outros fatores genéticos (Minamoto et al., 1999).

Os fatores ambientais conhecidos por desempenhar importantes papéis na etiologia do câncer humano incluem os carcinógenos químicos, como aqueles encontrados na fumaça do cigarro, os contaminantes da dieta, como a micotoxina aflatoxina B1, e os carcinógenos físicos, como a irradiação ultravioleta, o asbesto e o radônio. Outros fatores ambientais incluem bactérias e vírus patogênicos, como o *Helicobacter pylori*, papilomavírus humano (HPV) e vírus da hepatite B e C humana (HBV/HCV). Os estilos de vida que

ignoram os fatores de risco conhecidos, como hábito de fumar, excesso de exposição à luz solar, consumo de gorduras e estresse, são também fatores ambientais que contribuem para o desenvolvimento do câncer. Por outro lado, sabe-se que outros elementos do estilo de vida (ingestão de fibras, antioxidantes e exercício) reduzem o risco de desenvolvimento da doença (Minamoto et al., 1999).

O surgimento do DNA como o alvo crítico para os carcinógenos foi observado pela descoberta dos processos defeituosos de reparo do DNA em humanos propensos ao câncer (Yuspa, 2000). No que diz respeito aos carcinógenos físicos e químicos, eles são capazes de provocar alterações celulares pleiotrópicas a nível genético e epigenético e podem ser divididos em dois grupos: (a) agentes de dano ao DNA que induzem a formação de aductos de DNA e subseqüentes mutações, conhecidas como mutações somáticas; e (b) aqueles que alteram as vias celulares de transdução de sinais e resultam em alterações nas modificações pós-translacionais que afetam a conformação ou atividades de proteínas regulatórias celulares fundamentais. As alterações no primeiro grupo (mutações somáticas) são permanentes, enquanto que as do segundo grupo (pós-translacionais) são transitórias. Os efeitos dos fatores ambientais a nível proteico também são transitórios, como resultado do tempo de vida limitado de uma determinada proteína (Minamoto et al., 1998).

A fosfoproteína nuclear p53 possui propriedades inibidoras do câncer. O desenvolvimento do câncer humano envolve freqüentemente a inativação dessa função supressora através de diversos mecanismos, incluindo perda de alelos no *locus* do *TP53* (17p13), deleções, inserções, mutações em ponto ou o silenciamento da proteína p53 por formação de complexos com proteínas virais ou celulares. Essas mutações surgem somaticamente. Entretanto, as mutações do *TP53* podem também ser herdadas em algumas famílias com predisposição a múltiplos cânceres, como na Síndrome Li-Fraumeni (Hainaut et al., 1998). Segundo Bérout & Soussi (1998) e Van Oijen & Slootweg (2000a), a

inativação do *TP53* ocorre principalmente por mutações em ponto; as deleções/inserções do gene, as chamadas mutações *frameshift*, abrangem somente cerca de 10-15% dos casos.

As mutações do *TP53* abrangem cerca de 50% de todos os tumores humanos e ele desempenha um papel importante na carcinogênese de muitas malignidades diferentes, incluindo as de cabeça e pescoço (Goodsell, 1999; Van Oijen & Slootweg, 2000a; Bullock & Fersht, 2001). Bancos de dados com os registros das mutações de *TP53*, disponibilizados gratuitamente, foram criados com o objetivo de prover uma ferramenta para classificar, separar, recuperar, comparar e analisar essas mutações, de forma a gerar hipóteses sobre a história natural do câncer humano (Bérout & Soussi, 1998; Hainaut et al., 1998; Van Oijen & Slootweg, 2000a).

O câncer de cabeça e pescoço engloba o tão freqüente carcinoma epidermóide da cavidade bucal, faringe e laringe (Nagler, 2002). Atualmente, sabe-se que as mutações de *TP53* contribuem para a manifestação de aproximadamente 40% dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. Entretanto, existe uma variabilidade de resultados sobre as freqüências de mutação do *TP53* no câncer humano, devido aos diferentes métodos usados na avaliação do estado de p53, como a detecção imunistoquímica da proteína acumulada e a análise seqüencial parcial do DNA genômico (Balz et al., 2003). Para Saunders et al. (1999), além da metodologia usada, o tipo de material do tumor e a heterogeneidade dos sítios tumorais também influenciam nos resultados.

Como o gene *TP53* se estende ao longo de >20 Kb, e como a maioria das aberrações são mutações *missense* dentro da região de ligação ao DNA, a análise seqüencial do DNA genômico é comumente restrita aos exons 5-8 ou 5-9 do *TP53*, que compreendem as regiões *hotspots* para mutações desse gene. As mutações fora dessa região são consideradas raras (Kropveld et al., 1999; Balz et al., 2003). Para o carcinoma

epidermóide de cabeça e pescoço, as investigações envolvendo somente as regiões *hotspots* do *TP53* geraram uma frequência média de mutações de <50% (Balz et al., 2003).

Entretanto, para Kropveld et al. (1999), o sequenciamento de todos os exons (2-11) do gene *TP53* é vital para a avaliação da real incidência das mutações do gene no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Eles analisaram 25 pacientes com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço primários e não tratados, sequenciando todos os onze exons do *TP53*. A frequência de mutação encontrada foi de 91%, sendo que 33% dessas mutações ocorreram fora do domínio central de ligação ao DNA. Setenta e seis por cento das mutações eram mutações em ponto. Somente quatro deleções e 1 inserção foram encontradas. A superexpressão da proteína p53 foi encontrada em 64% dos casos. Os autores acreditam que a abordagem utilizada provê uma melhor concordância, que neste estudo foi de 61%, entre a análise do gene e a imunistoquímica da proteína. Giovanini (2001) analisou 10 carcinomas epidermóides da cavidade bucal através de imunistoquímica e PCR-SSCP (Reação em cadeia da polimerase – Polimorfismo conformacional de fita única) e encontrou uma concordância de 44,5% entre a imunistoquímica e a mutação do gene *TP53*. Entretanto, a análise seqüencial do gene abrangeu somente os exons 5-9.

Ma et al. (1998), também analisando os exons 5-9, encontraram 45% de mutações do gene *TP53* em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, porém não houve relação estatisticamente significativa entre mutação do gene e marcação da proteína p53. Além disso, somente as mutações tiveram papel prognóstico para os pacientes, pois o risco de recorrência locorregional foi significativamente maior nos pacientes com mutação do *TP53* do que naqueles com o gene normal. Os autores observaram também uma maior frequência de mutações do *TP53* nos pacientes do sexo masculino quando comparados aos do sexo feminino. Um maior consumo de tabaco por parte do primeiro grupo poderia ser, segundo os autores, uma possível explicação para esse achado. Tseng et al. (1999),

analisando carcinomas de células pequenas de pulmão, também observaram freqüência maior de mutação do *TP53* no sexo masculino. Eles sugeriram a possibilidade de uma susceptibilidade maior desse sexo a certos carcinógenos presentes na fumaça do cigarro os quais induziriam, preferencialmente, mutação do *TP53*.

Balz et al. (2003) encontraram uma elevada freqüência de mutação de *TP53* (79%) no estudo de 123 carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço através da análise de toda a região codificante do *TP53*. Vinte e dois por cento dessas mutações estavam localizadas fora dos exons 5-9.

Saunders et al. (1999) analisaram somente carcinomas de laringe (42 biópsias) e a freqüência de mutação de *TP53* encontrada foi de 48%. Vinte por cento das alterações ocorreram fora das regiões *hotspots* (exons 5-8). Um dado interessante foi que os autores observaram uma diferença no padrão de mutação dentro e fora dos exons 5-8. Dentro dessa região, a maioria das alterações eram mutações *missense*, porém, fora dessa região houve uma predominância de inserções e deleções, resultando em uma proteína truncada.

Nos estudos realizados somente em carcinomas epidermóides da cavidade bucal, as freqüências de mutações variam entre 7-89% quando se considera somente a análise dos exons 5-9 (Kusama et al., 1996; Friedrich et al., 2000; Liao et al., 2000; Ostwald et al., 2000; Shahnava et al., 2000; Cruz et al., 2002a; Tsurusako et al., 2002; Yamazaki et al., 2003; Yanamoto et al., 2003). O sítio de localização do tumor talvez possa influenciar nos resultados. Tsurusako et al. (2002) avaliaram 28 carcinomas epidermóides de língua para mutações de *TP53* (exons 5-8) e apenas dois espécimes tumorais mostraram mutação para o gene (7%). Uma das mutações era do tipo *missense* e a outra, *nonsense*. Os autores relataram que a freqüência de mutação de *TP53* no carcinoma epidermóide de língua varia de 12,5 – 66,7%. Nesse estudo, eles sugeriram que os tecidos tumorais nos quais não houve mutação de *TP53* tiveram outras alterações genéticas, como a amplificação de

Mdm2, as quais podem ser equivalentes à inativação da função normal da proteína p53, ou podem estar envolvidas em outras vias carcinogênicas.

No estudo de Kusama et al. (1996), 19 em 57 casos (33.3%) de carcinomas epidermóides de cavidade bucal expressaram a proteína p53, sendo que destes, nove ocorreram em língua. Dos casos positivos para a proteína, 89,5% mostraram mutação do gene nos exons 5-8. Shahnava et al. (2000) também encontraram uma alta frequência de mutação de *TP53* (75%) em carcinomas epidermóides da cavidade bucal, atribuída, segundo os autores, ao pequeno tamanho da amostra (oito casos) e à própria seleção dos casos.

Bradley et al. (2001) investigaram mutações de *TP53* sequenciando os exons 2-11 do gene em 25 amostras de carcinomas epidermóides da cavidade bucal. Sessenta e quatro por cento dos casos mostraram mutação de *TP53* e houve uma clara relação entre o tipo de mutação do gene e a presença nuclear da proteína p53 nas células carcinomatosas. Todos os nove casos de mutação *missense* mostraram coloração positiva para a proteína p53, compatível com a presença de uma proteína p53 mutada, anormalmente estabilizada. Por outro lado, todos os sete casos de mutação que resultaram em uma proteína p53 truncada, foram negativos no estudo imunohistoquímico.

Eicheler et al. (2002) consideram importante incluir as regiões intrônicas no sequenciamento do gene *TP53*. Para eles, o sequenciamento apenas dos exons ignora as mutações intrônicas que levam a *missplicing* e podem, portanto, subestimar sistematicamente a frequência de mutação do gene *TP53*.

Em muitos tipos de câncer, padrões específicos de mutação podem ser identificados, os quais são moldados por mutagênese sítio-específica e por seleção biológica. Existem muitos mutagenes que podem danificar o DNA de modo específico,

deixando 'impressões digitais' no genoma das células cancerosas. Nos cânceres relacionados ao tabaco (pulmão, cabeça e pescoço), padrões órgãos-específicos são observados, com muitas mutações compatíveis com aquelas experimentalmente induzidas pelos carcinógenos do tabaco (Szymańska & Hainaut, 2003).

Os epitélios da cavidade bucal e do lábio podem ser expostos a vários carcinógenos que têm o potencial de induzir mutação de *TP53*. O fumo de tabaco e o consumo de álcool são fatores de risco significantes para os carcinomas epidermóides da cavidade bucal (Ostwald et al., 2000; Cruz et al., 2002a). Na Índia, cerca de 90% dos carcinomas bucais de células escamosas estão relacionados ao uso de tabaco, onde os hábitos tanto de fumar quanto mascar o tabaco são comuns (Soni et al., 2002).

Lavieille et al. (1995) realizaram biópsias de carcinomas epidermóides, lesões pré-neoplásicas e mucosa aparentemente normal da região de cabeça e pescoço de 107 pacientes. Um interessante dado observado foi a expressão da proteína p53 nas mucosas normais (9%) e nas hiperplasias (37%) dos pacientes com histórico de fumo e consumo de álcool, sustentando a idéia de que as alterações de *TP53* ocorrem em um estágio precoce da tumorigênese.

Brennan et al. (1995a) sequenciaram o gene *TP53* (exons 5-9) em espécimes tumorais de 129 pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, dos quais 102 eram recém diagnosticados e 27 haviam sido previamente tratados, mas recorreram. Quarenta e dois por cento dos neoplasmas apresentaram pelo menos uma mutação de *TP53*. Os autores observaram que essas mutações do gene correlacionavam-se fortemente com o fumo de cigarros, tanto isoladamente quanto em combinação com o consumo de álcool. Essas mutações foram 3,5 vezes mais comuns entre pacientes que fumavam cigarros e consumiam álcool do que entre os que não fumavam e não bebiam.

Ostwald et al. (2000) analisaram 94 pacientes para mutações de *TP53* através de PCR/TGGE (Reação em cadeia da polimerase – Eletroforese em gel com gradiente de temperatura), onde 34 apresentavam carcinomas de lábio e 60, carcinomas intrabucais. Nesses pacientes, a frequência de mutação de *TP53* encontrada foi de 43%, porém somente os exons 5-8 do gene foram analisados. Eles observaram também, um índice significativamente maior de não-fumantes entre os pacientes com câncer de lábio do que naqueles com câncer intrabucal. Nos tumores de lábio, o alto índice de mutação do *TP53* em não-fumantes, sugere que não apenas os componentes carcinogênicos do tabaco, mas também outros fatores, como a luz solar, podem ser responsáveis pelas mutações.

Quando compararam os padrões de imunopositividade e imunonegatividade para a proteína p53, de 55 pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade bucal com os hábitos de fumo e consumo de álcool, Cruz et al. (2002a) não encontraram nenhuma associação significativa. Entretanto, quando os autores modificaram a análise, adotando outro critério baseado na união da análise mutacional do gene com a imunohistoquímica da proteína, eles observaram que o hábito de fumar estava significativamente associado com a imunocoloração de p53, porém nenhuma associação foi encontrada entre o consumo de álcool e a imunocoloração para essa proteína nos tumores.

Os numerosos estudos sobre detecção imunohistoquímica da proteína p53 em tumores são baseados nos achados de que a p53 tem um papel fundamental na regulação do ciclo celular de células que contêm dano subletal em seu genoma, e que ela se torna detectável por meio de imunohistoquímica se ela se acumular no núcleo da célula (Stoll et al., 1998). A proteína p53 selvagem, por possuir uma meia-vida curta, seria, portanto, teoricamente não detectável pela imunohistoquímica (Nylander et al., 2000; Gonzales-Moles et al., 2001). Porém, discrepâncias relatadas entre as mutações de *TP53* nos tumores e a imunodetecção da proteína p53 sustentam a idéia de que outros mecanismos podem ser operantes na expressão da proteína p53 (Regezi et al., 1995; Saunders et al., 1999).

A associação entre perda de função de p53 e seu acúmulo no núcleo da célula pode ser rompida em algumas situações. Salvo as falhas na técnica, como manuseio inapropriado do tecido, resultados falso-negativos obtidos com o método imunistoquímico podem ser causados por uma deleção dos alelos *TP53* ou por uma mutação *nonsense*, levando a uma fosfoproteína não-estabilizada e reduzida (Stoll et al., 1998; Saunders et al., 1999; Nylander et al., 2000).

Os resultados falso-positivos podem ser resultado de um aumento da sensibilidade da técnica imunistoquímica, visto que anticorpos monoclonais diferentes e com sensibilidades variadas têm sido empregados para a detecção da p53, de forma que quantidades fisiológicas da p53 podem ser detectadas (Piffkó et al., 1995; Würfl et al., 1997; Stoll et al., 1998; Saunders et al., 1999; Gonzales-Moles et al., 2001). A utilização de pré-tratamento para recuperação dos epitopos antigênicos também pode influenciar nos resultados da imunistoquímica (Dowell & Ogden, 1996; Tan et al., 1996; Binks et al., 1997; McNicol & Richmond, 1998), principalmente no que diz respeito a p53 selvagem que pode se tornar mais detectável (Tan et al., 1996).

Esses resultados falso-positivos podem resultar também de uma regulação positiva da p53 causada pela influência de agentes nocivos sobre o genoma da célula, correspondendo à regulação fisiológica que estabiliza a proteína p53 pela mudança no grau de fosforilação, a fim de reparar o dano ao DNA ou levar a célula à apoptose. De forma semelhante, a ligação da p53 a proteínas virais pode também levar à estabilização e acúmulo da mesma. Apesar disso, neste caso, a perda da função da p53 está associada a um resultado imunistoquímico equivalente a uma mutação *missense* (Stoll et al., 1998; Nylander et al., 2000; Gonzales-Moles et al., 2001).

Partridge et al. (1999) relacionaram os achados da imunistoquímica para p53, em 45 carcinomas epidermóides da cavidade bucal, com o número de aberrações genéticas

detectadas, e sugeriram que a imunoistoquímica pode detectar a p53 selvagem estabilizada como consequência de dano contínuo ao DNA. Nesses casos, a proteína p53 pode estar estabilizada pela interação com a proteína Mdm2, a qual falharia em degradar a p53, ou por interação com outras moléculas regulatórias.

Devido a todos os fatores supracitados, existe uma variabilidade de resultados nos estudos sobre expressão imunoistoquímica da proteína p53 em carcinomas epidermóides da cavidade bucal (Friedrich et al., 2000; Gonzales-Moles et al., 2001). Dados de alguns estudos apontam para uma variabilidade em torno de 19-94% (Warnakulasuriya & Johnson, 1992; Kusama et al., 1996; Kerdpon et al., 1997; Stoll et al., 1998; Ng et al., 1999; Partridge et al., 1999; Schoelch et al., 1999a; Sittel et al., 1999; Ünal et al., 1999; Cruz et al., 2000; Guedes-Pinto, 2000; Lam et al., 2000; Giovanini, 2001; Gonzales-Moles et al., 2001; Cruz et al., 2002a; Gonzales-Moles et al., 2002b; Soni et al., 2002; Yanamoto et al., 2002; Yanamoto et al., 2003). Ainda assim, a identificação imunoistoquímica da proteína p53 tem sido associada a uma ampla variedade de malignidades humanas, indicando que esta detecção pode ser útil como marcador de malignidade e possivelmente pré-malignidades, já que ela pode representar um evento precoce no processo de transformação maligna (Regezi et al., 1995).

Cruz et al. (2000) analisaram 42 amostras de mucosas não-malignas adjacentes a carcinomas epidermóides da cavidade bucal, os respectivos carcinomas e seis metástases em linfonodos e notaram que a expressão suprabasal de p53 na mucosa não-maligna foi encontrada apenas adjacientemente aos carcinomas p53-positivos, sugerindo que as alterações de p53 podem ocorrer precocemente na carcinogênese e que essas alterações são mantidas ao longo da progressão para uma malignidade evidente (carcinoma e metástase em linfonodos).

A localização da marcação imunistoquímica para a proteína p53, tanto no epitélio bucal normal quanto nas lesões com potencial de transformação maligna e nos carcinomas, tem gerado algumas discussões (Cruz et al., 1998; Stoll et al., 1998; Cruz et al., 2000; Cruz et al., 2002b; Gonzales-Moles et al., 2002b). Em condições normais, a camada basal é o único sítio epitelial onde a proliferação celular é produzida, enquanto que nas camadas suprabasais ocorre apenas maturação, de modo que a expressão basal e suprabasal da p53 têm, provavelmente, implicações distintas. Presumindo-se que o papel protetor da p53 é exercido durante o ciclo celular e que o compartimento proliferativo do epitélio bucal normal é a camada basal, espera-se que a proteína p53, quando detectável no epitélio normal, esteja restrita à camada basal (Cruz et al., 1998; Gonzales-Moles et al., 2002b).

Atualmente, a presença e o grau de atipia são utilizados com frequência para prever a transformação maligna (Cruz et al., 2002b). Entretanto, Cruz et al. (2002b) acreditam que a avaliação da atipia é relativamente subjetiva, e os valores de predição para transformação maligna ainda estão longe do ideal. Segundo eles, os biomarcadores, como a proteína p53, parecem prometer mais como marcadores prognósticos precoces.

Em um estudo prévio (Cruz et al., 1998), estes mesmos autores relataram que as mutações do gene *TP53* têm sido detectadas em 15-19% das lesões bucais potencialmente malignas, incluindo lesões com atipia leve. Eles procuraram testar a hipótese da expressão suprabasal de p53 ser um indicador inicial de transformação maligna e verificaram também se esta expressão teria um maior valor preditivo para a transformação do que a presença da atipia. O padrão suprabasal de expressão de p53 mostrou-se significativamente associado com o desenvolvimento de carcinoma e 86% das lesões pré-malignas que mostraram p53 acima da camada basal transformaram-se em carcinoma. Em contraste, apenas 22% das lesões pré-malignas p53-negativas e 15,8% daquelas que demonstraram p53 somente na camada basal, desenvolveram carcinoma no mesmo local.

Com base nesses resultados, os autores interpretaram a expressão de p53 na mucosa bucal sem potencial maligno como uma resposta fisiológica das células ao estresse genotóxico, enquanto que a presença de p53 nas camadas suprabasais refletiria provavelmente a presença da proteína mutada, que consegue persistir por períodos mais longos de tempo.

No estudo realizado em 2002 (Cruz et al., 2002b), os autores analisaram 56 espécimes constituídos por lesões bucais potencialmente malignas, principalmente leucoplasias, carcinomas epidermóides da cavidade bucal que se desenvolveram a partir dessas lesões, e um grupo controle, ou seja, pacientes cujas lesões potencialmente malignas não progrediram para carcinoma. Todas as lesões que mostraram coloração suprabasal de p53 nas margens do corte histológico desenvolveram eventualmente um carcinoma, enquanto que em 3 de 4 casos onde essas alterações estavam ausentes das margens da lesão, não tiveram recorrência nem progrediram para carcinoma. Os resultados encontrados confirmaram a opinião dos autores sobre a importância da coloração suprabasal da p53 como marcador valioso na predição da transformação maligna das lesões que têm esse potencial. Entretanto, a avaliação da atipia permaneceu como uma importante ferramenta a ser utilizada, visto que ela mostrou ser o marcador com maior sensibilidade (em termos de proporção de lesões de alto risco que ela consegue identificar).

Kerdpon et al. (1997) estudaram a expressão de p53 em oito espécimes de mucosa bucal normal, 50 casos de hiperplasias induzidas por irritação causada por próteses, 41 atipias e 48 carcinomas epidermóides da cavidade bucal. Todos os casos de mucosa bucal normal foram negativos para a proteína. Nas hiperplasias, atipias e carcinomas, a porcentagem de marcação positiva foi, respectivamente, de 36%, 85% e 94%. A marcação positiva nas hiperplasias foi justificada como resultado da atividade proliferativa nos tecidos hiperplásicos. O aumento crescente na proporção de casos positivos para p53 da hiperplasia para a atipia e desta para o carcinoma, pode indicar um envolvimento de p53

não somente na transformação neoplásica, mas também nos eventos proliferativos. A presença ou ausência de coloração para p53 não pôde ser utilizada para predizer o curso das atipias, já que apenas três das p53-positivas evoluíram para carcinoma, e nenhuma das p53-negativas tiveram essa evolução.

Outros trabalhos apresentaram porcentagens mais modestas de expressão de proteína p53 em suas amostras.

Kusama et al. (1996) não observaram nenhuma marcação em hiperplasias e a porcentagem de expressão positiva nas atipias e nos carcinomas foi de 27,3% e 33,3%, respectivamente. Yanamoto et al. (2002) encontraram expressão positiva para a p53 em 63,8% dos carcinomas e em 20% dos espécimes de mucosa bucal normal. Em um outro estudo destes mesmos autores (Yanamoto et al., 2003), a coloração nuclear para p53 em 63 carcinomas epidermóides da cavidade bucal foi detectada nas regiões basal e suprabasal. Nas atipias (48 casos) a coloração mostrou-se predominantemente basal e todos os casos (10) de epitélio bucal normal foram p53-negativos. A porcentagem de positividade encontrada nas atipias e nos carcinomas foi de 47,9% e 63,5%, respectivamente.

Stoll et al. (1998) consideram importante o padrão da expressão da p53 nas atipias da mucosa bucal e orofaringe fora do tecido tumoral, mas não acreditam que esta seja útil na determinação do prognóstico dos pacientes com carcinomas mais invasivos. Eles observaram que o estágio tumoral dos 107 carcinomas epidermóides primários de cavidade bucal e orofaringe analisados, bem como a graduação histológica das lesões e o envolvimento de linfonodos foram preditores significantes da sobrevida e sobrevivência livre de doença. As reações imunoistoquímicas realizadas para as proteínas p53, Mdm2 e Waf-1 (do inglês, *wild type p53 activated fragment one*) falharam como preditoras das mesmas características.

De forma semelhante, Gonzales-Moles et al. (2002b) acreditam que a presença da expressão de p53 no epitélio adjacente ao tumor pode ser um evento precoce na tumorigênese bucal e essa expressão nas atipias desses epitélios pode atuar como um marcador de uma alteração maior de p53 no tumor. Porém, eles descartaram a expressão suprabasal de p53 como marcador objetivo da presença ou severidade da atipia epitelial.

A associação da graduação histológica das lesões com a imunexpressão de marcadores moleculares, como a p53, também tem sido alvo de investigações. Schoelch et al. (1999b) observaram o aumento na porcentagem de células p53-positivas com a progressão histológica de carcinomas epidermóides da cavidade bucal.

Nos carcinomas epidermóides da cavidade bucal, fontes alternativas de investigação genética têm sido utilizadas. Como na cavidade bucal o carcinoma epidermóide é facilmente banhado pelas secreções normais da região, Liao et al. (2000) propuseram que as células esfoliadas do tumor poderiam ser detectáveis na saliva. As mutações do gene *TP53* no tumor primário dos pacientes serviriam como marcadores para estas células. A saliva foi coletada de voluntários sadios e de pacientes com carcinomas epidermóides da cavidade bucal; o DNA da saliva foi extraído e amplificado através de PCR (Reação em cadeia da polimerase). O estudo abrangia regiões do exon 4 e do intron 6 do *TP53*. Dos pacientes com carcinoma, 62,5% continham mutações de *TP53* contra 18,52% dos indivíduos sadios. Um provável *hotspot* para mutação foi identificado no exon 4, codon 63. Na região do intron 6 do *TP53* não houve diferenças entre os dois grupos. Para os autores, o número de células epiteliais na saliva é relativamente alto porque a mucosa escamosa estratificada bucal renova rapidamente as suas populações celulares. Além disso, a vantagem de se usar uma fonte de DNA a partir da saliva é que ela é não-invasiva, rápida, indolor e de fácil realização.

Kannan et al. (2001) examinaram 25 pacientes com carcinomas epidermóides da cavidade bucal a fim de avaliar a perda de heterozigosidade (LOH) dos genes *TP53*, *Rb* (retinoblastoma) e *APC* (*Adenomatous polyposis coli*). As amostras foram coletadas diretamente do tumor, das margens de resseção e da mucosa normal não envolvida. Nas margens de resseção, seis casos foram LOH-positivos. Histopatologicamente, 5 desses 6 casos mostravam-se livres de malignidade e todos apresentaram recorrência da doença em um período de até 24 meses.

2.2.4 p53 E O CÂNCER DE LÍNGUA

As mutações do gene *TP53* representam as anormalidades genéticas mais comuns nos cânceres humanos (Hollstein et al., 1991), e podem causar inativação da função supressora tumoral do gene e da proteína (Ünal et al., 1999). Uma ampla variedade de estudos (Lavieille et al., 1995; Cruz et al., 1998; Stoll et al., 1998; Guedes-Pinto, 2000; Giovanini, 2001; Gonzales-Moles et al., 2001; Famulski et al., 2002; Gonzales-Moles et al., 2002b; Soni et al., 2002) tem focalizado as alterações de p53 nas malignidades de cabeça e pescoço e da cavidade bucal, especificamente, na tentativa de utilização dessas alterações como marcadores moleculares.

Apesar do número crescente de pacientes acometidos por carcinoma epidermóide de língua, pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares envolvidos na origem e desenvolvimento desses neoplasmas. O papel do gene *TP53* ainda não está bem estabelecido nessas lesões, devido à pequena quantidade de estudos sobre esta relação (Tsurusako et al., 2002).

As prevalências das mutações do *TP53* no carcinoma epidermóide de língua variam entre os relatos da literatura: 7% (Tsurusako et al., 2002); 18,1% (Sorensen et al., 1997); 34,06% (Hsieh et al., 2001); 43,75% (Bradley et al., 2001) e 54% (Atula et al., 1996).

A maioria dos trabalhos abrangem somente a análise dos exons 5-8 ou 9 do *TP53* (Atula et al., 1996; Hsieh et al., 2001; Tsurusako et al., 2002), um trabalho avaliou os exons 4-10 (Sorensen et al., 1997), e um avaliou toda a seqüência codificante do gene (Bradley et al., 2001). Burns et al. (1994) encontraram o mesmo tipo de mutação do *TP53* em carcinomas epidermóides de língua e nas metástases em linfonodos dos mesmos pacientes.

Algumas hipóteses para explicar os baixos índices de mutação do *TP53*, encontrados nos estudos de Sorensen et al. (1997) e Tsurusako et al. (2002), foram sugeridas pelos autores destes trabalhos. Tsurusako et al. (2002) acreditam que na amostra por eles estudada, outras alterações genéticas, que não as do *TP53*, ocorreram e foram equivalentes à inativação da função normal da proteína p53.

Segundo Sorensen et al. (1997), embora o carcinoma epidermóide de língua usualmente ocorra em pacientes com mais de 60 anos de idade, cerca de 4% desses tumores ocorrem em pacientes com idades inferiores a 40 anos, e que muitas vezes não fazem uso de tabaco ou álcool. O objetivo do estudo foi estabelecer o papel da mutação do gene *TP53* na carcinogênese bucal desse grupo de pacientes em particular. Portanto, a seleção dos 11 pacientes para a amostra foi baseada em dois critérios: presença de carcinoma epidermóide e idade inferior a 40 anos. Seis dos 11 pacientes não apresentaram história de exposição ao álcool e tabaco. As duas mutações do *TP53* encontradas ocorreram nos tumores de pacientes que utilizavam tabaco, álcool ou ambos. Assim, esses resultados sugerem que as mutações do gene são menos freqüentes nos carcinomas epidermóides que acometem pacientes jovens não-fumantes e não-consumidores de álcool, do que nos fumantes jovens e na população em geral. Apesar da pequena amostra utilizada, este estudo está em acordo com o realizado por Brennan et al. (1995a).

Regezi et al. (1999) avaliaram a marcação imunistoquímica para as proteínas p53, p21, Rb e Mdm2, em dois grupos de 36 pacientes com carcinoma epidermóide de

língua, divididos pela idade em: menos de 35 anos versus mais de 75 anos. Para os autores, existem razões para se acreditar que a etiologia e a patogênese do carcinoma epidermóide, especialmente o de língua, pode ser diferente entre pacientes mais jovens e pacientes mais velhos. A curta duração (poucas décadas) de exposição aos carcinógenos ambientais, a falta de lesões pré-existentes, e o controle mais difícil da doença local nos pacientes mais jovens, sugerem que mecanismos moleculares diferentes podem estar atuando nesses pacientes. Como as proteínas do ciclo celular podem encontrar-se superexpressadas nos cânceres bucais, elas são, portanto, boas candidatas para avaliação dos grupos de pacientes com menos e mais idades. Entretanto, neste estudo, não foram encontradas diferenças significantes na expressão dessas proteínas entre os dois grupos. A expressão positiva para a proteína p53 foi vista em 50% e 67% dos pacientes do grupo mais jovem e mais velho, respectivamente. Por essa razão, sugeriu-se que talvez as diferenças moleculares entre os tumores de pacientes com menos e mais idades estejam associadas com diferentes tipos de mutações genéticas ou de fatores regulatórios dos genes.

Nagler et al. (2002) avaliaram a prevalência de coloração imunoistoquímica para as proteínas relacionadas à apoptose: p53, bcl-2 (do inglês, *B cell lymphoma/leukemia*), c-erbB-2 e índice apoptótico, em 55 pacientes, escolhidos aleatoriamente, de uma amostra de 116 casos de carcinoma epidermóide de língua. A prevalência de marcação positiva para a p53 foi de 60%, estando em acordo com a encontrada por Xie et al. (1999), que foi de 61%. Um dado interessante encontrado foi a correlação entre o estágio TNM e a coloração positiva para o índice de apoptose isoladamente, medido pelo método *terminal dUTP nick-end-labelling* (TUNEL), ou em combinação com marcação positiva para p53. Mais de 60% dos pacientes cujos tumores foram positivos tanto para o TUNEL quanto para a p53, eram pacientes em estágio II.

Guedes-Pinto (2000) realizou um estudo em uma amostra de carcinomas epidermóides de lábio (07 casos), língua (13 casos) e mucosa jugal (07 casos), para

avaliação da expressão da proteína p53. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre o padrão de marcação para a proteína e o sítio da lesão.

De forma semelhante, Famulski et al. (2002) analisaram uma amostra de 129 pacientes com carcinoma epidermóide da cavidade bucal, e não foram encontradas correlações entre a marcação da proteína p53 e o sítio do tumor, incluindo os de língua. Entretanto, observou-se que os carcinomas pouco diferenciados (G3) estavam localizados, com maior frequência, na língua e no assoalho bucal, embora esta relação não tenha sido estatisticamente significativa. Khademi et al. (2002) encontraram uma associação positiva entre a expressão da p53 e o envolvimento nodal em uma amostra de 53 pacientes com carcinoma epidermóide de língua e laringe.

O número de casos com imunopositividade para a proteína p53 nos carcinomas epidermóides da cavidade bucal variam entre os diversos relatos da literatura. Há também variabilidade de resultados dependendo do sítio anatômico da lesão, conforme mostrado no QUADRO 1.

QUADRO 1

PORCENTAGENS DE CASOS IMUNOPOSITIVOS PARA A PROTEÍNA P53 EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DA CAVIDADE BUCAL

AUTORES	SÍTIO ANATÔMICO PRIMÁRIO	N	p53 + (%)
Piffko et al. (1995)	Assoalho bucal	22	40
Atula et al. (1996)	Língua	39	87
Yan et al. (1996)	Língua	24	66,7
	Mucosa bucal	36	30,6
Ito et al. (1998)	Língua	24	37,5
Bova et al. (1999)	Língua	143	62,2
Ünal et al. (1999)	Língua	70	27,1
Xie et al. (1999)	Língua	85	61
Yao et al. (1999)	Língua	52	60
Guedes-Pinto (2000)	Lábio	7	42,8
	Língua	13	53,8
	Mucosa jugal	7	57,1
Badaracco et al. (2000)	Língua	13	85
	Outros sítios da cavidade bucal	12	58
Lam et al. (2000)	Assoalho bucal	16	75
	Gengiva	4	75
	Língua	4	50
	Mucosa bucal	11	91
	Palato duro	8	63
	Palato mole	6	67
	Região retromolar	6	67
	Orofaringe	1	100
Famulski et al. (2002)	Assoalho bucal	25	48
	Lábio	12	16,6
	Língua	73	39,7
Haas et al. (2002)	Língua	14	57,1
	Laringe	11	54,5
	Tonsilas	24	66,6
Khademi et al. (2002)	Língua	13	92
	Laringe	40	63
Nagler et al. (2002)	Língua	55	60

N= número de casos.

3 **Objetivos**

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar, pela técnica imunoistoquímica, o padrão de imunomarcção da proteína p53 em carcinomas epidermóides bucais, localizados em sítios anatômicos diferentes.

3.2 Objetivos Específicos

Comparar o padrão de imunomarcção da proteína p53 em carcinomas epidermóides de língua com os outros sítios anatômicos da cavidade bucal;

Comparar o padrão de imunomarcção da proteína p53 do tumor com outras variáveis: idade, sexo e graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral.

4 **Material e Métodos**

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização da Amostra

Foram selecionadas, aleatoriamente, 43 amostras de carcinomas epidermóides primários de boca. As amostras teciduais, fixadas em formalina a 10% e embebidas em parafina, foram provenientes dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os dados clínicos como sexo, idade e localização anatômica da lesão foram obtidos a partir de informações contidas nas fichas dos exames anatomopatológicos.

As lesões foram agrupadas de acordo com o sítio anatômico primário de acometimento. Foram excluídos os casos onde o sítio primário do tumor não pôde ser estabelecido, aqueles cujo material era inadequado ou insuficiente para as análises em hematoxilina e eosina (HE) e imunohistoquímica, e os casos localizados na semimucosa ou pele do lábio inferior.

Os cortes histológicos dos casos selecionados, corados em HE, foram obtidos do arquivo de lâminas do Laboratório com a finalidade de confirmação do diagnóstico de carcinoma epidermóide da cavidade bucal e graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral (GHM-FIT).

4.2 Técnica imunoistoquímica

Para a evidenciação imunoistoquímica do antígeno p53, empregou-se a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase com o anticorpo monoclonal DO1 (Santa Cruz Biotechnology), considerando-se a metodologia descrita a seguir.

Inicialmente, foram obtidos cortes histológicos de 3 μm de espessura das lesões, fixadas em solução de formol (10%) e incluídas em parafina, montados em lâminas de vidro previamente recobertas com organossilano (3-aminopropiltriétoxi-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA).

Após a desparafinização por três passagens em soluções de xilol, realizadas à temperatura ambiente por 18 horas, 15 e cinco minutos, respectivamente, os cortes histológicos foram hidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 90% e 70%, cinco minutos cada banho). A seguir, foram imersos por dez minutos em solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol, para remoção do pigmento formólico, sendo então rapidamente lavados em banhos de água destilada para remoção das soluções.

Posteriormente às lavagens com água destilada, os cortes foram submetidos a tratamento com tampão EDTA (Ácido etilediamino tetracético), 1 mM (milimolar), pH 8,2, em ambiente de vapor sem pressão, por 25 minutos, para recuperação dos epitopos antigênicos pesquisados.

Após resfriamento da solução, alcançando o equilíbrio térmico com o ambiente, os cortes foram lavados em água corrente e, em seguida, água destilada e submetidos ao bloqueio de enzimas endógenas. Os cortes foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio a 10 volumes, por dois banhos de 15 minutos cada, visando o bloqueio da

atividade da peroxidase endógena dos tecidos. Em seguida, os cortes foram lavados por solução de tampão TRIS-HCl (tris-hidroximetil-aminometano/ácido clorídrico), pH 7,4, em três banhos de cinco minutos.

Procedeu-se então, à incubação com o anticorpo primário, diluído em solução tampão TRIS-HCl, pH 7,4, realizada em câmara úmida, a 4°C, por 18 horas. Para amplificação da reação, utilizou-se o sistema LSAB⁺ (Dako), incubando-se primeiramente o anticorpo secundário biotilado e depois o complexo estreptavidina-biotina, ambos em câmara úmida, por 20 minutos. Entre essas etapas, os cortes foram lavados por solução de tampão TRIS-HCl, pH 7,4, em três banhos de cinco minutos.

A revelação da reação foi obtida com solução cromógena de diaminobenzidina (Dako) a 0,02%, dissolvida em 100 ml de tampão TRIS-HCl, pH 7,4, e ativada por 1,2 ml de peróxido de hidrogênio a 10 volumes. Em seqüência, as lâminas foram lavadas em água corrente, por cinco minutos.

Os cortes foram então contra-corados por hematoxilina de Mayer, por 2,5 minutos, recebendo, após essa etapa, um banho em solução de hidróxido de amônio, a 10%, para remoção do excesso de contracoloração. Os cortes foram lavados em água corrente por cinco minutos e desidratados em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e três vezes a 100%), diafanizados em três banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, EUA).

Carcinomas epidermóides bucais sabidamente positivos para a expressão de p53 foram utilizados como controle positivo. Omissão do anticorpo primário foi empregada como controle negativo das reações.

4.3 Contagem das células

Para a análise da imunomarcação, índices foram construídos baseados na percentagem de células marcadas entre pelo menos 500 células tumorais contadas para cada caso, em ao menos três campos histológicos, utilizando-se microscópio ZEISS, em aumento de 400 vezes, com retículo de 0,025 mm². A contagem das células foi realizada por um único observador, após a realização do índice de correlação intra-observador. Foram selecionadas as áreas mais representativas do tumor e considerou-se como células positivas para a proteína p53 as que apresentavam marcação intranuclear, amarronzada ou acastanhada, independentemente da intensidade da marcação.

A positividade para a p53, para cada caso, foi considerada como a presença de mais de 10% de células neoplásicas imunomarcadas para a proteína (Sittel et al., 1999).

4.4 Estudo Anatomopatológico

A avaliação das características de histo e morfodiferenciação das lesões foi realizada pela graduação histológica de malignidade (GHM) do fronte de invasão tumoral (FIT), segundo os parâmetros descritos por Bryne *et al.* (1992). Tal método consiste na avaliação do padrão de invasão tumoral, da queratinização, do pleomorfismo nuclear e da resposta do hospedeiro ao tumor (intensidade do infiltrado inflamatório). A cada critério são atribuídos valores entre 1 e 4, que são somados para a obtenção da GHM final, que portanto varia de 4 a 16. Quanto maior o grau atribuído ao tumor, menor é sua diferenciação, ou seja, lesões com GHM entre 4 e 8 são consideradas como bem diferenciadas, entre 9 e 12 como moderadamente diferenciadas, e entre 13 e 16 como pouco diferenciadas.

A reprodutibilidade do estadiamento histopatológico por esta metodologia foi estabelecida através da graduação dos casos por dois observadores (concordância

interobservador), após padronização, de forma independente. Os parâmetros completos para análise estão destacados no QUADRO 2. Para essa avaliação, os cortes histológicos de 5µm de espessura corados em hematoxilina e eosina, foram observados em microscopia óptica, com aumento de 400 vezes em campos consecutivos.

QUADRO 2

SISTEMA DE GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA PARA CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA, PROPOSTO POR BRYNE *ET AL.* (1992)

Parâmetro morfológico	GRADUAÇÃO			
	Valor 1	Valor 2	Valor 3	Valor 4
Grau de queratinização	Altamente queratinizado (acima de 50% das células)	Moderadamente queratinizado (entre 20 e 50% das células)	Queratinização mínima (entre 5 e 20% das células)	Queratinização ausente (entre 0 e 5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pleomorfismo nuclear pequeno (acima de 75% de células maduras)	Pleomorfismo nuclear moderado (entre 50 e 75% de células maduras)	Pleomorfismo nuclear abundante (entre 25 e 50% de células maduras)	Pleomorfismo nuclear extremo (entre 0 e 25% de células maduras)
Padrão de invasão	Expansivo, bordas tumorais amplas e bem delimitadas	Infiltrativo, feixes, bandas ou cordões sólidos	Cordões ou pequenos grupos com mais de 15 células	Células individuais ou pequenos grupos com menos de 15 células
Infiltrado inflamatório	Intenso	Moderado	Leve	Ausente

4.5 Análise Estatística

Após verificação da normalidade da amostra pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($p=0,20$), a comparação dos índices de imunomarcção do antígeno p53, segundo o sítio primário, sexo, idade e graduação histológica de malignidade no fronte de invasão tumoral das lesões foi realizada pelos testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney, correlação de Spearman e Kruskal-Wallis, respectivamente. O teste de Mann-Whitney foi aplicado para a comparação dos índices de imunomarcção para a p53 entre as lesões que tiveram como sítio primário a língua com cada um dos outros sítios isoladamente e com os outros sítios

agrupados. Quando os casos de língua foram excluídos da análise, os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney foram empregados para a comparação dos demais sítios anatômicos entre si. Para comparação das variáveis sexo, idade e sítio anatômico primário dos casos considerados como p53-positivos e p53-negativos, os testes Exato de Fisher, Mann-Whitney e Exato de Fisher foram aplicados respectivamente. Para todas as análises, foi utilizado o programa BioEstat, versão 3.0 (Ayres *et al.*, 2003).

Em todas as análises, probabilidades (p) menores que 5% de igualdade entre os grupos comparados foram consideradas estatisticamente significativas.

5 Resultados

5 RESULTADOS

As lesões estudadas foram provenientes de indivíduos entre 39 e 82 anos de idade (média de 58,6 anos), sendo 35 homens (81,4%) e 8 mulheres (18,6%). As lesões foram agrupadas de acordo com o sítio primário de acometimento, sendo 18 casos em língua (41,86%), 8 em assoalho bucal (18,60%), 6 em rebordo alveolar (13,95%), 4 na região retromolar (9,30%). Pela pouca freqüência de acometimento, os casos ocorridos em lábio (n= 3), mandíbula (n= 2), túber maxilar (n= 1) e mucosa jugal (n= 1), foram reunidos em um único grupo denominado *outras regiões da cavidade bucal*, representando 16,27% da amostra; (TABELA 1).

TABELA 1

DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES EM ESTUDO, SEGUNDO SEXO, IDADE E SÍTIO ANATÔMICO PRIMÁRIO DA LESÃO

CASO	SEXO	IDADE	SÍTIO ANATÔMICO PRIMÁRIO
1	M	50	Rebordo alveolar
2	M	49	Mandíbula
3	M	57	Rebordo alveolar
4	M	39	Mandíbula
5	M	57	Região retromolar
6	M	67	Assoalho bucal
7	F	56	Língua
8	M	65	Língua
9	M	79	Língua
10	M	56	Língua
11	F	82	Assoalho bucal
12	M	48	Assoalho bucal
13	M	44	Língua
14	F	51	Língua
15	F	79	Língua
16	M	71	Lábio
17	M	72	Língua
18	M	61	Língua
19	M	60	Assoalho bucal
20	M	50	Língua
21	F	70	Língua
22	F	81	Língua
23	M	59	Língua
24	M	77	Rebordo alveolar
25	M	64	Rebordo alveolar
26	M	45	Região retromolar
27	M	81	Assoalho bucal
28	M	53	Língua
29	M	50	Língua
30	F	48	Lábio
31	M	79	Rebordo alveolar
32	M	67	Túber maxilar
33	M	45	Língua
34	M	45	Assoalho bucal
35	M	55	Assoalho bucal
36	M	41	Lábio
37	M	68	Região retromolar
38	F	48	Língua
39	M	43	Língua
40	M	55	Mucosa jugal
41	M	42	Assoalho bucal
42	M	53	Rebordo alveolar
43	M	56	Região retromolar

A localização imunoistoquímica para a proteína p53 foi observada como marcação castanha intranuclear, geralmente de forte intensidade (FIGURAS 1 e 2).

FIGURA 1- Padrão de imunomarcação da p53 – caso controle positivo, aumento de 100x.

FIGURA 2 - Padrão de imunomarcação da p53 – caso controle positivo, aumento de 400x.

O índice médio de marcação imunoistoquímica para a p53 nos tumores avaliados foi de 48,37% (desvio-padrão de 30,56%, mediana de 59,6%), variando entre 0 e 91,7%. Foram observados 33 tumores com positividade para a proteína (76,8%) e 10 tumores (23,2%) p53-negativos (índices inferiores a 10% de células marcadas), descritos na TABELA 2, de acordo com o sítio primário.

TABELA 2

DISTRIBUIÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PARA P53 NOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE ACORDO COM O SÍTIO ANATÔMICO PRIMÁRIO

Localização primária	N	p53 +	p53 -	TOTAL
Língua	18	14 (77,8%)	4 (22,2%)	100%
Assoalho Bucal	8	7 (87,5%)	1 (12,5%)	100%
Rebordo Alveolar	6	4 (66,7%)	2 (33,3%)	100%
Região Retromolar	4	3 (75,0%)	1 (25,0%)	100%
Outras regiões da cavidade bucal	7	5 (71,5%)	2 (28,5%)	100%
TOTAL	43	33 (76,8%)	10 (23,2%)	100%

N = número de casos

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,34$) entre as médias dos índices de marcação imunoistoquímica de p53 nas lesões dos diversos sítios analisados. De forma semelhante, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as médias dos índices de marcação para p53 considerando-se os casos de língua com os outros grupos reunidos ($p = 0,96$), nem quando comparados os casos de língua com cada um dos outros grupos isoladamente; (TABELA 3; GRÁFICO 1).

TABELA 3

MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS ÍNDICES DE MARCAÇÃO PARA P53 NOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES, DE ACORDO COM O SÍTIO ANATÔMICO PRIMÁRIO

Localização primária	p53 (%)	± SD (%)	Valor <i>p</i>
Língua	48,0%	30,4%	<i>p</i> = 0,96 ^a (n.s)
Assoalho Bucal	64,2%	29,0%	<i>p</i> = 0,14 ^b (n.s)
Rebordo Alveolar	40,0%	32,2%	<i>p</i> = 0,50 ^b (n.s)
Região Retromolar	49,2%	33,3%	<i>p</i> = 1,00 ^b (n.s)
Outras regiões da cavidade bucal	37,8%	31,3%	<i>p</i> = 0,39 ^b (n.s)

SD = desvio padrão; **n.s** = valor estatisticamente não significativo;

^a valor *p* encontrado quando comparados os casos de língua com os outros sítios agrupados; ^b valor *p* encontrado quando comparados os casos de língua com cada um dos outros grupos isoladamente.

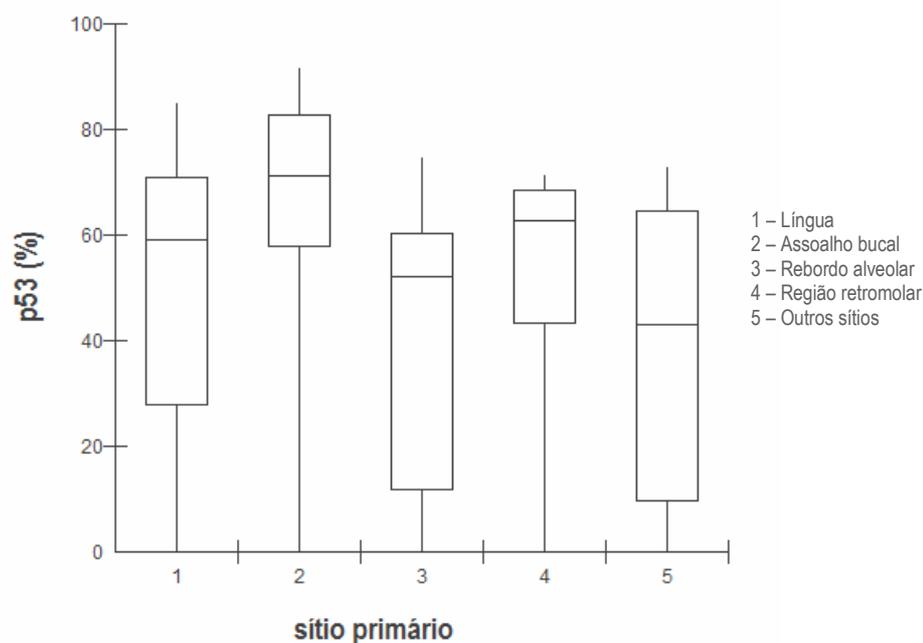


GRÁFICO 1- Comparação dos índices de imunomarcção para a proteína p53 de acordo com o sítio anatômico primário da lesão.

Quando excluídos os casos de língua da análise, a comparação das médias dos índices de marcação para p53 entre os outros sítios anatômicos da amostra também não revelou significância estatística ($p = 0,23$). Comparando-se esses sítios anatômicos, dois a dois, e excluindo-se os casos de língua, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre assoalho bucal com rebordo alveolar ($p= 0,09$), região retromolar ($p= 0,35$) e outras regiões da cavidade bucal ($p= 0,08$); entre rebordo alveolar com região retromolar ($p= 0,52$) e com outras regiões da cavidade bucal ($p= 1,00$); e entre região retromolar com outras regiões da cavidade bucal ($p= 0,57$).

Em relação à idade e ao sexo dos pacientes, não foram encontradas relações estatisticamente significantes com as médias dos índices de marcação para p53 ($p= 0,97$ e $p= 0,61$, respectivamente); (GRÁFICOS 2 e 3). Os índices médios encontrados para os gêneros masculino e feminino foram de 47,5% e 51,8%, respectivamente.

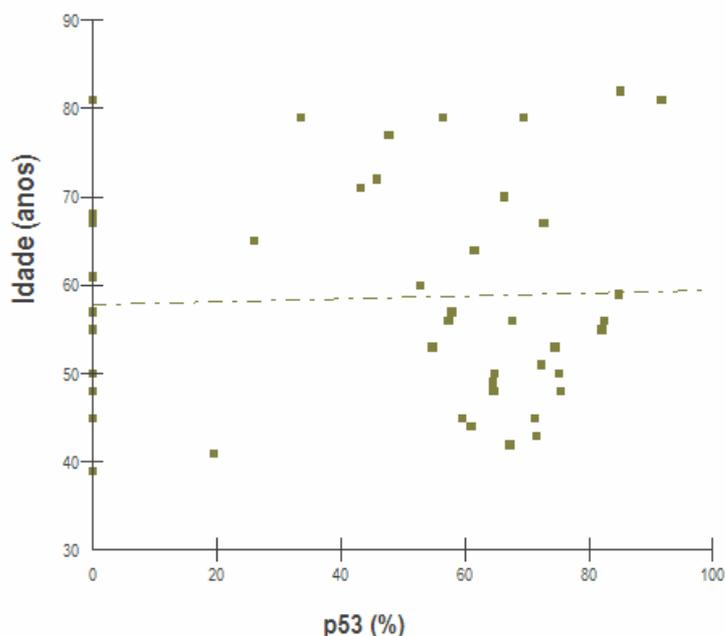


GRÁFICO 2 - Distribuição dos índices de imunomarcagem para a proteína p53 de acordo com a idade dos pacientes.

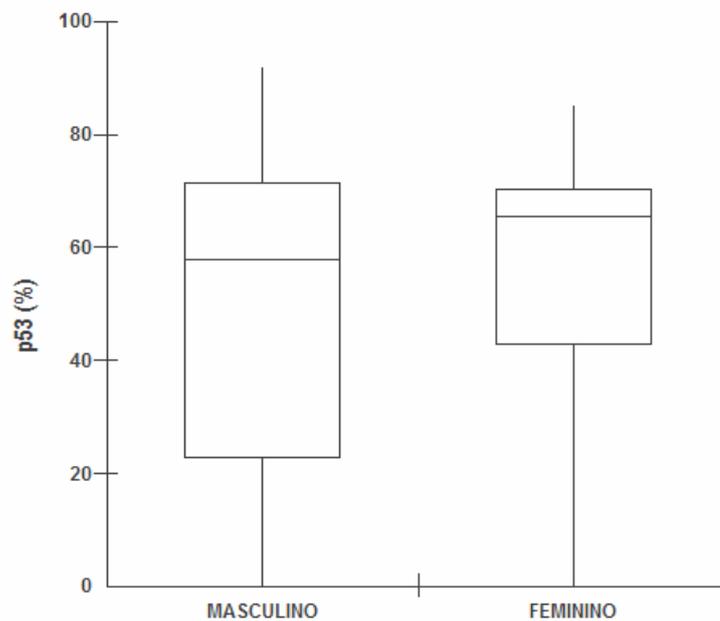


GRÁFICO 3- Distribuição dos índices de imunomarcção para a proteína p53 segundo o gênero.

Quando os casos foram analisados considerando-se os p53-negativos e p53-positivos, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes em relação à idade dos pacientes ($p= 0,77$), em relação ao sexo ($p = 0,98$), e em relação ao sítio primário na língua comparado com os outros sítios, reunidos ($p= 1,00$) ou isoladamente: assoalho bucal ($p= 1,00$), rebordo alveolar ($p= 0,61$), região retromolar ($p= 0,97$) e outras regiões da cavidade bucal ($p= 0,99$); (TABELA 4).

TABELA 4

COMPARAÇÃO ENTRE A MARCAÇÃO DE P53 E AS VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS DOS CASOS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE BUCAL

Variável		Casos p53 +	Casos p53 -	Valor p=
Idade		33	10	0,77
Gênero	M	27	8	0,98
	F	6	2	
Língua com outros sítios agrupados		14	4	1,00
		19	6	
Língua com assoalho bucal		14	4	1,00
		7	1	
Língua com rebordo alveolar		14	4	0,61
		4	2	
Língua com região retromolar		14	4	0,97
		3	1	
Língua com Outras regiões da cavidade bucal		14	4	0,99
		5	2	

M= masculino; F= feminino

Em 41 das 43 amostras em estudo foi possível a avaliação da graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral (GHM-FIT). No presente trabalho, lesões com GHM entre 4 e 8 foram consideradas bem diferenciadas (14 casos, 34,15% da amostra), entre 9 e 12 como moderadamente diferenciadas (17 casos, 41,46% dos casos), e entre 13 e 16 como pouco diferenciadas (10 casos, 24,39% das lesões).

Das lesões bem diferenciadas no fronte de invasão tumoral, 8 estavam localizadas na língua, 1 em assoalho bucal, 4 em rebordo alveolar e 1 em outras regiões da cavidade bucal. Dentre as moderadamente diferenciadas, 3 localizavam-se em língua, 5 em assoalho bucal, 3 em região retromolar e 6 em outras regiões da cavidade bucal. Seis casos de língua, um de assoalho bucal, dois de rebordo alveolar e um de região retromolar mostraram-se pouco diferenciados. A TABELA 5 ilustra a distribuição dos casos quanto ao

sítio anatômico primário, a graduação histológica do fronte de invasão tumoral e a imunomarcção para a proteína p53 (positividade ou negatividade).

TABELA 5

DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES EM ESTUDO, SEGUNDO SÍTIOS ANATÔMICOS PRIMÁRIOS, GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DE MALIGNIDADE DO FRONTE DE INVASÃO TUMORAL (GHM-FIT) E IMUNOMARCAÇÃO PARA A P53

Sítio anatômico primário	GHM-FIT escore final	GHM-FIT (diferenciação)	p53
Língua	—	—	-
Língua	6	Bem	+
Língua	7	Bem	+
Língua	7	Bem	+
Língua	7	Bem	-
Língua	8	Bem	+
Língua	8	Bem	+
Língua	8	Bem	+
Língua	8	Bem	+
Língua	9	Moderadamente	+
Língua	9	Moderadamente	-
Língua	10	Moderadamente	+
Língua	13	Pouco	+
Língua	13	Pouco	+
Língua	13	Pouco	-
Língua	13	Pouco	+
Língua	14	Pouco	+
Língua	14	Pouco	+
Assoalho bucal	—	—	+
Assoalho bucal	6	Bem	+
Assoalho bucal	9	Moderadamente	+
Assoalho bucal	10	Moderadamente	+
Assoalho bucal	10	Moderadamente	+
Assoalho bucal	11	Moderadamente	+
Assoalho bucal	11	Moderadamente	+
Assoalho bucal	13	Pouco	-
Rebordo alveolar	6	Bem	+
Rebordo alveolar	7	Bem	+
Rebordo alveolar	7	Bem	+
Rebordo alveolar	8	Bem	-
Rebordo alveolar	13	Pouco	+
Rebordo alveolar	14	Pouco	-
Região retromolar	10	Moderadamente	+
Região retromolar	10	Moderadamente	+
Região retromolar	12	Moderadamente	+
Região retromolar	13	Pouco	-
Outros sítios	8	Bem	-
Outros sítios	9	Moderadamente	+
Outros sítios	10	Moderadamente	+
Outros sítios	10	Moderadamente	+
Outros sítios	11	Moderadamente	+
Outros sítios	12	Moderadamente	+
Outros sítios	12	Moderadamente	-

A positividade para a proteína p53 foi observada em 11 (78,6%) das lesões bem diferenciadas, 15 (88,2%) das moderadamente e 6 (60,0%) das pouco diferenciadas; (TABELA 6; GRÁFICO 4).

TABELA 6

DISTRIBUIÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO PARA P53 NOS CARCINOMAS EPIDERMÓIDES, DE ACORDO COM A GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA DE MALIGNIDADE DO FRONTE DE INVASÃO TUMORAL (GHM-FIT)

GHM-FIT	N	p53 +	p53 -	TOTAL
Bem diferenciados	14	11 (78,6%)	3 (21,4%)	100%
Moderadamente diferenciados	17	15 (88,2%)	2 (11,8%)	100%
Pouco diferenciados	10	6 (60,0%)	4 (40,0%)	100%
TOTAL	41	32 (78,0%)	9 (22,0%)	100%

N= número de casos

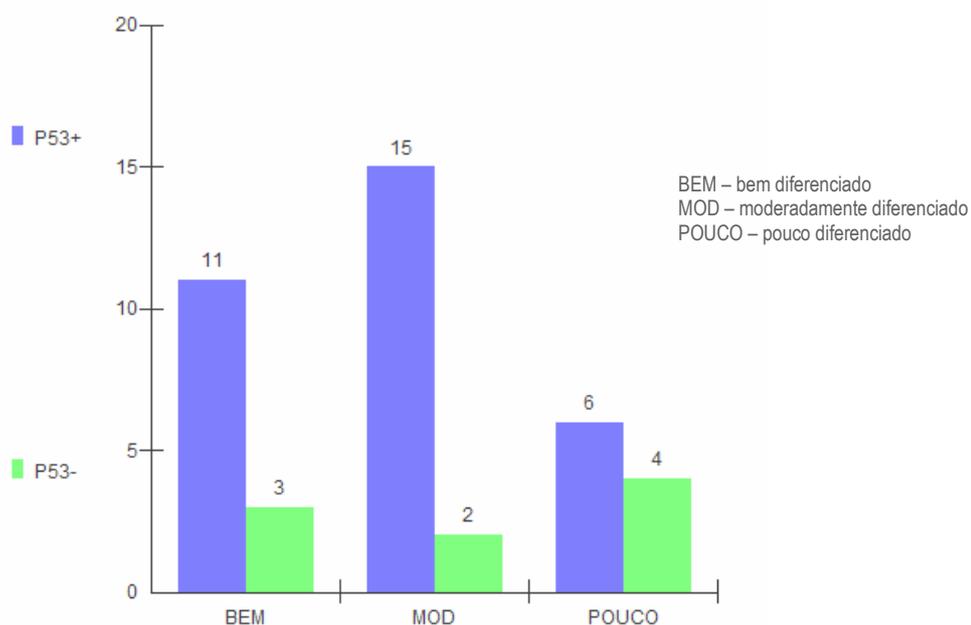


GRÁFICO 4- Distribuição da imunomarcagem para a proteína p53 nos carcinomas epidermóides, de acordo com a graduação histológica de malignidade do frente de invasão tumoral.

As lesões pouco diferenciadas foram as que mostraram a menor média dos índices de imunomarcção para a p53 (35,0%), quando comparadas com as lesões bem (49,7%) e moderadamente (55,1%) diferenciadas. Entretanto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as médias dos índices de imunomarcção para a p53 e a graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral ($p= 0,36$).

Em algumas lesões p53-negativas na área tumoral, o epitélio adjacente ao tumor, quando presente, por vezes apresentava células positivas, usualmente nas camadas inferiores do epitélio (FIGURA 3). Nos tumores bem diferenciados, havia aparentemente maior número de células marcadas na periferia das ilhotas (FIGURA 4). Alguns casos mostraram marcação com distribuição por toda a extensão da lesão (FIGURA 5).

FIGURA 3 - Imunomarcção da p53 no epitélio adjacente ao tumor, aumento de 400x.

FIGURA 4 - Maior padrão de imunomarcção da p53 nas células periféricas das ilhotas tumorais, aumento de 400x.

FIGURA 5- Padrão difuso de imunomarcção da p53, aumento de 400x.

6 **Discussão**

6 DISCUSSÃO

A observância das alterações no gene *TP53* e seu produto protéico, a p53, no câncer humano levou ao seu estabelecimento como um importante marcador molecular para esta malignidade.

Detectar a doença, monitorar sua progressão, determinar o prognóstico para o paciente e acompanhar a resposta à terapia (Sidransky, 2002) são os principais objetivos do estudo da p53, bem como de outros marcadores moleculares, nas pesquisas sobre câncer.

A relevância das alterações do gene *TP53* e de seu produto protéico no carcinoma epidermóide bucal foi sendo determinada na medida em que estas alterações foram detectadas em estágios precoces da doença (atipias epiteliais) e se mantiveram ao longo de sua progressão ou transformação em malignidade (Warnakulasuriya & Johnson, 1992; Regezi et al., 1995; Kerdpon et al., 1997; Yanamoto et al., 2002; Yamazaki et al., 2003).

Assim, o presente estudo objetivou analisar a marcação da proteína p53 em carcinomas epidermóides de diversos sítios anatômicos da cavidade bucal, através de método imunohistoquímico.

Nesse trabalho, foram consideradas como positivas todas as células tumorais com coloração castanha intranuclear, independente da intensidade da imunomarcação, concordando com as considerações feitas por Nylander et al. (2000) de que a avaliação da intensidade de marcação é uma tarefa bastante difícil, pois esta intensidade depende de muitas variáveis, como o pré-tratamento, a concentração do anticorpo e o ambiente térmico. Eles postulam que a intensidade de marcação só pode ser verdadeiramente avaliada sob

condições reproduzíveis, ou seja, através de um equipamento programado para tal finalidade.

O índice médio de imunomarcação observado nos tumores avaliados foi de 48,37%, com 76,8% da amostra (33 casos) mostrando positividade para a p53, valor este que se encontra inserido na grande variabilidade de resultados vista na literatura para este tipo de lesão. A esses resultados discrepantes, que variam de 19% (Warnakulasuriya & Johnson, 1992) a 94% (Kerdpon et al., 1997), são atribuídos alguns fatores influenciadores, como a metodologia empregada, o tipo de material do tumor e a heterogeneidade dos sítios tumorais primários (Saunders et al., 1999).

Geralmente, considera-se a imunomarcação da proteína p53 como um resultado de alterações genéticas no *TP53*, visto que a p53 selvagem, por ter uma meia-vida curta, teoricamente não seria detectável pela técnica imunoistoquímica (Stoll et al, 1998; Nylander et al., 2000). Entretanto, algumas armadilhas na avaliação dos resultados podem levar a interpretações equivocadas. Alguns autores apontam para a ocorrência freqüente de resultados falso-positivos e falso-negativos (Stoll et al., 1998; Sittel et al., 1999; Nylander et al., 2000; Giovanini, 2001; Gonzales-Moles et al, 2001).

Pela metodologia empregada, nossos resultados não podem confirmar se a proteína detectada nos tumores representa o tipo selvagem ou mutado, visto que não foi nosso objetivo fazer investigações ao nível do gene *TP53*. Entretanto, a validade da técnica imunoistoquímica tem sua importância assegurada pelo grau de concordância entre os índices de marcação da proteína e a presença de alterações no gene, encontrado em alguns estudos recentes (Ma et al., 1998; Kropveld et al., 1999; Giovanini, 2001; Balz et al., 2003). Isto provavelmente tem relação com a metodologia desses estudos, visto que realizaram a análise de toda a sequência do gene *TP53* (exons 2-11) e não somente os exons da região de ligação ao DNA (exons 5-9), onde ocorre a maioria das mutações. A

freqüência de mutações do *TP53* fora das regiões *hotspots* alcança índices de até 33% (Kropveld et al., 1999).

Por outro lado, o tipo de mutação ocorrida também pode influenciar na concordância entre mutação do gene e imunomarcação da proteína nas células neoplásicas. Bradley et al. (2001) observaram imunomarcação para p53 em todos os casos de uma amostra de carcinomas epidermóides da cavidade bucal em que houve mutação do tipo *missense* no *TP53*, e em nenhum dos casos com mutação *nonsense*.

Cruz et al. (2002a) tentaram identificar um valor de corte para o qual a imunomarcação da p53 teria valor preditivo para mutações no gene. Excluindo todos os casos p53-negativos da análise estatística, eles concluíram que a expressão de p53 em mais de 25% das células tumorais era indicativa de mutações no *TP53*.

O presente trabalho fez uso de recuperação dos epitopos antigênicos pesquisados, previamente à incubação com o anticorpo primário, utilizando o EDTA como solução tampão. A literatura relata a ocorrência de mascaramento dos epitopos em tecidos fixados (Dowell & Ogden, 1996; Tan et al., 1996; Binks et al., 1997; McNicol & Richmond, 1998), partindo daí a necessidade de desenvolvimento de técnicas que promovam a recuperação desses antígenos. A extensão da perda de imunoreatividade depende da proteína a ser detectada e do anticorpo empregado (McNicol & Richmond, 1998). O EDTA é um agente quelante que, segundo McNicol & Richmond (1998), pode melhorar ainda mais a recuperação de alguns antígenos, devido ao papel que a liberação de cálcio do tecido pode desempenhar no desmascaramento dos epitopos.

Por outro lado, a recuperação de antígenos pode tornar a proteína p53 selvagem mais detectável. O estudo de Tan et al. (1996) ilustra bem a diferença representada pela recuperação antigênica na detecção de p53 em lesões benignas, pré-malignas e carcinomas

epidermóides de laringe. Nenhuma das lesões benignas mostrou superexpressão antes da recuperação e, após a sua utilização, 92,5% dessas lesões mostraram positividade para p53, porém somente nas camadas basal e parabasal do epitélio. Nas lesões pré-malignas e malignas, houve um aumento nos índices de marcação após a recuperação.

Os diferentes anticorpos utilizados na técnica imunoistoquímica para a detecção da proteína p53 também podem influenciar nos resultados. Na literatura consultada, observamos que não há um protocolo padronizado quanto à metodologia empregada, quanto aos anticorpos utilizados e as suas respectivas diluições. Segundo Piffkó et al. (1995), esse padrão variado de reatividade entre os anticorpos provavelmente reflete a expressão de diferentes epitopos do antígeno p53, resultando em p53-imunofenótipos heterogêneos dos carcinomas. Autores como Würll et al. (1997) mostram a presença de relevância prognóstica para diversos anticorpos anti-p53, na seguinte ordem decrescente de significância: DO-1 > Pab1801 > DO-7 > CM-1 > Pab240. Apesar dos anticorpos DO-1 e DO-7 reconhecerem epitopos da mesma região, esses mesmos autores encontraram um índice de marcação 20% maior para o DO-1. Embora não tenha sido objetivo desse trabalho, acreditamos que seria de grande interesse a implementação da análise de sobrevida de pacientes com carcinomas epidermóides da cavidade bucal em relação ao clone utilizado.

Neste estudo, utilizamos o anticorpo monoclonal DO-1, capaz de detectar tanto a p53 selvagem quanto a mutada e que, à semelhança do anticorpo DO-7, reconhece epitopos localizados entre os aminoácidos 20-25 (Würll et al., 1997) na porção N-terminal da proteína. A diluição empregada (1:100) foi a que se mostrou mais adequada para os casos avaliados.

Nossos resultados mostraram 23,2% (10 casos) de tumores p53-negativos. Para esses casos, concordamos com as conclusões propostas por Dowell & Ogden (1996), Stoll et al. (1998), Saunders et al. (1999) e Nylander et al. (2000), de que, salvo falhas na técnica,

tais tumores podem não apresentar marcação para p53 devido à deleção bialélica do gene *TP53*, por níveis muito baixos da p53 selvagem ou mutada, por uma mutação do tipo *nonsense* ou por uma proteína p53 truncada na sua porção N-terminal, que não seria então reconhecida pelo anticorpo DO-1.

Embora não tenha sido pesquisada nesse estudo, acreditamos também que uma possível alteração na proteína Mdm2 poderia alterar a expressão da p53 nos tumores, visto que a relação de *feedback* existente entre ambas já foi demonstrada por outras pesquisas (Ashcroft & Vousden, 1999; Vousden, 2002; Michael & Oren, 2003). O acúmulo da proteína Mdm2, causada pela amplificação do gene, promoveria a degradação da p53 tornando difícil, ou até impossível, a sua detecção imunistoquímica (Nylander et al., 2000).

Um dado interessante por nós observado, e que está em acordo com os achados de Piffkó et al. (1995), foi a ocorrência de marcação positiva para a proteína p53 no epitélio não-tumoral adjacente a tumores p53-negativos. Esses autores sugeriram algumas possíveis razões para a imunoreatividade focal ou esparsa de p53 nas regiões não-tumorais adjacentes aos carcinomas: a) as alterações de p53 podem representar um evento precoce na carcinogênese bucal; b) elas podem servir como uma possível base para um campo de cancerização comum nesta região anatômica; c) ou, elas podem simplesmente indicar um sistema p53 normalmente funcionante e ativado em células geneticamente estressadas, que podem ser restauradas, sofrer apoptose, ou entrar no círculo vicioso da transformação maligna, onde o papel do sistema p53 pode ser substituído por outros mecanismos. Outros trabalhos (Cruz et al., 1998; Gonzales-Moles et al., 2002b; Horta, 2003) corroboram com as justificativas acima apresentadas.

No nosso ponto de vista, a ocorrência de marcação para p53 no epitélio adjacente não-tumoral em tumores p53-negativos tem seu fundamento em dois conceitos já exaustivamente discutidos na literatura: primeiramente, no fato de que o processo de

carcinogênese bucal envolve múltiplas etapas e vários eventos são necessários para a produção de um tumor maligno (Cruz et al., 2002a), além das alterações do *TP53* (Nylander et al., 2000). Em segundo lugar, no papel que a p53 desempenha como sistema de defesa das células com dano no seu material genético (Nylander et al., 2000). Com base nesses dois argumentos, acreditamos que a marcação no epitélio não-tumoral pode representar, ou uma tentativa inicial de defesa desse sistema conduzido pela p53 selvagem, ou o início do acúmulo da p53 já mutada (dano genético irreversível, embora passível de sofrer apoptose). Por outro lado, a não-marcação para a proteína no tumor propriamente dito, segue as mesmas justificativas sugeridas anteriormente para os nossos casos p53-negativos, ou seja, vários outros eventos genéticos podem ter ocorrido, incluindo o surgimento de novas alterações, em outras vias ligadas ou não ao sistema da p53.

Ainda em relação à marcação positiva no epitélio adjacente não-tumoral, outros estudos (Stoll et al., 1998; Guedes-Pinto, 2000; Haas et al., 2002), e nossas próprias observações demonstraram que esta marcação encontrava-se restrita às camadas consideradas como proliferativas do epitélio (basal e parabasal), a qual, segundo Gonzales-Moles et al. (2002b) e em acordo com nossas considerações anteriores, corresponderia a p53 selvagem funcionando normalmente. Eles acrescentam que a ocorrência de marcação nas camadas suprabasais do epitélio, onde ocorre somente maturação, refletiria a presença da p53 mutada. Cruz et al. (2000) encontraram expressão suprabasal de p53 na mucosa não-maligna apenas quando esta estava adjacente a carcinomas p53-positivos, sugerindo que estas alterações são mantidas na progressão para uma franca malignidade.

Quanto à distribuição da imunomarcação nas células neoplásicas, notamos, nos casos mais diferenciados, uma maior concentração da mesma na periferia das ilhotas tumorais, em concordância com os achados de outros trabalhos (Atula et al., 1996; Stoll et al., 1998; Schoelch et al., 1999b; Guedes-Pinto, 2000; Lam et al., 2000; Giovanini, 2001; Cruz et al., 2002a). Esta distribuição na camada mais externa das ilhotas representa,

segundo Stoll et al. (1998), a camada de células menos diferenciadas, enquanto que a porção interna refere-se às células mais maduras. Em alguns casos, observamos a imunomarcção em toda a extensão da lesão, o que também já foi citado em outras pesquisas (Atula et al., 1996; Schoelch et al., 1999b; Guedes-Pinto, 2000; Giovanini, 2001). Schoelch et al. (1999b) observaram em sua amostra de carcinomas epidermóides da cavidade bucal que a imunomarcção da p53 encontrava-se distribuída nos dois padrões, difuso ou com maior concentração na periferia das ilhotas, independentemente do grau de diferenciação da lesão.

O principal objetivo de nosso trabalho foi comparar a marcação da p53 em carcinomas epidermóides da cavidade bucal, localizados em sítios anatômicos diferentes. Segundo Saunders et al. (1999), a heterogeneidade dos sítios tumorais pode ter influência nos resultados dessa marcação.

A literatura relata algumas características específicas inerentes aos sítios anatômicos língua e assoalho bucal, com maior ênfase em língua, que podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão de malignidades e que, desta forma, podem ter uma maior significância para o prognóstico dos pacientes.

Acreditamos que o estabelecimento da língua como um sítio anatômico importante para o carcinoma epidermóide da cavidade bucal esteja baseado nos próprios dados epidemiológicos que apontam esta lesão como a malignidade intrabucal mais comum, com um prognóstico ruim (Nagler et al., 2002; Neville & Day, 2002; Tsurusako et al., 2002). Nossa própria casuística mostrou uma maior frequência dessas lesões no tecido lingual: 18 em 43 casos, correspondendo a quase 50% da amostra.

Os tumores dessa região, embora permitam o tratamento cirúrgico com ampla excisão local, possuem altos índices de recorrência e um índice de mortalidade que pode

alcançar os 50% (Ünal et al., 1999; Nagler et al., 2002). A abundância de vasos linfáticos próximos à língua e assoalho bucal também favorece uma disseminação precoce para os linfonodos cervicais, o que reduz para menos de 20% a sobrevida em 5 anos para os pacientes (Atula et al., 1996; Dias et al., 2001).

A invasão perineural, o estágio tumoral (T) e as metástases nodais foram vistos como os parâmetros mais importantes para predizer a recorrência do carcinoma epidermóide de língua (Ünal et al., 1999).

Os efeitos de alguns carcinógenos no tecido lingual, observado através de estudos experimentais (Culp et al., 1998; Kosinska et al., 1999; Von Pressentin et al., 1999; Schwartz et al., 2000), fornecem algumas evidências para o entendimento do processo de carcinogênese que ocorre neste sítio anatômico em particular. Destacamos o trabalho de Von Pressentin et al. (1999), que cita a presença, em maior quantidade, das enzimas reductases, responsáveis pela metabolização do 4NQO, no tecido lingual do que em outros sítios anatômicos da boca.

Por estas características acima expostas, e com base no que já discutimos anteriormente a respeito do papel do *TP53* e da p53 na carcinogênese bucal, objetivamos neste trabalho analisar, comparativamente, a marcação imunoistoquímica para a p53 em língua com os outros sítios avaliados.

Entretanto, nossos resultados não revelaram diferenças estatisticamente significantes entre os índices encontrados para a p53 nos sítios investigados. Estes achados são semelhantes aos de Warnakulasuriya & Johnson (1992), Kerdpon et al. (1997), Guedes-Pinto (2000), Nylander et al. (2000), Famulski et al. (2002) e Haas et al (2002).

Discordantes de nossos achados, Kusama et al. (1996) relataram uma frequência maior de marcação da p53 em carcinomas epidermóides de língua e palato, embora nenhum tratamento estatístico tenha sido empregado para verificar a significância deste resultado. Yan et al. (1996) encontraram correlação entre marcação de p53 e sítio tumoral, porém a avaliação compreendeu somente duas regiões da cavidade bucal: língua e mucosa jugal, sendo que a frequência de marcação foi maior na primeira.

Encontramos a maior média dos índices de imunomarcação nos casos de assoalho bucal (64,2%), valor aproximado ao daqueles encontrados por alguns autores (Guedes-Pinto, 2000; Lam et al., 2000), mas que se distancia de outros resultados (Piffkó et al., 1995; Giovanini, 2001; Famulski et al., 2002). O reduzido número de casos de assoalho bucal de nossa amostra pode ter influenciado os resultados.

Não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre as médias dos índices de marcação para a p53 das lesões de língua com os outros grupos estudados, nem quando estes foram agrupados nem quando avaliados isoladamente com os casos linguais. A maioria dos outros trabalhos que comparam esta marcação da p53 com os sítios anatômicos, não tinham como objetivo específico comparar a língua com os outros sítios da cavidade bucal (Warnakulasuriya & Johnson, 1992; Kerdpon et al., 1997; Guedes-Pinto, 2000; Nylander et al., 2000; Famulski et al., 2002; Haas et al., 2002). Mesmo quando as lesões de língua foram excluídas da análise, os outros sítios não evidenciaram correlação com a p53.

A partir da observação da ausência de significância estatística entre a imunomarcação da p53 no carcinoma epidermóide de língua em relação aos outros sítios anatômicos, acreditamos que outros fatores, tanto moleculares quanto clínicopatológicos, podem ter relação com a prevalência da lesão nesse sítio anatômico. As alterações de p53 não são os únicos fatores com relevância para a carcinogênese bucal (Nylander et al., 2000)

e, portanto, outros estudos, analisando outras variáveis, merecem ser continuados até que se elucidem os mecanismos específicos do processo de carcinogênese lingual.

Além do sítio anatômico, avaliamos também a relação da imunomarcção para p53 com outros parâmetros clinicopatológicos, a saber, idade, sexo e graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral.

De acordo com Regezi et al. (1999), o carcinoma epidermóide da cavidade bucal ocorre mais comumente em pacientes de mais idade, entre a 5ª e 8ª décadas de vida (40-80 anos), embora pesquisas na literatura abordem a ocorrência em pacientes mais jovens (Sorensen et al., 1997). Nossos resultados mostraram uma variação entre 39-82 anos, com média e mediana de 58,6 e 56,0 anos, respectivamente, o que está em conformidade com os achados da literatura (Ng et al., 1999; Guedes-Pinto, 2000; Lam et al., 2000). Em relação às médias dos índices de marcação para a proteína p53, não houve correlação estatisticamente significativa destas com a idade dos pacientes, como foi observado também no estudo de Yan et al. (1996).

Quando agrupamos os pacientes em relação à idade, em lesões p53-positivas e p53-negativas, observamos uma média de idade ligeiramente maior (59 anos) nos casos p53-positivos quando comparados aos p53-negativos (57 anos), porém sem significância estatística. Contrariamente aos nossos resultados, Lam et al. (2000) encontraram correlação significativa entre as médias de idade, maior nos casos p53 negativos, e a marcação para a p53.

Com relação ao gênero, a literatura mostra uma maior prevalência de carcinomas epidermóides da cavidade bucal no sexo masculino (Guedes-Pinto, 2000; Famulski et al., 2002). Nossos achados exibiram também uma nítida predileção de ocorrência dessas lesões em homens (81,4% dos casos).

A média dos índices de imunomarcção para a p53 foi de 47,5% no sexo masculino e 51,8%, no sexo feminino, porém sem associação estatisticamente significativa, como foi também observado por Yan et al. (1996), Ng et al. (1999), Guedes-Pinto (2000) e Lam et al. (2000) em suas amostras. O estudo de Ma et al. (1998) não encontrou correlação com a expressão da proteína, mas foi observada uma freqüência significativamente maior de mutações do gene *TP53* nos pacientes do sexo masculino. Os autores acreditam que essa maior freqüência seja reflexo de um maior consumo de tabaco pelos pacientes do sexo masculino em relação aos do sexo feminino, enquanto Tseng et al. (1999) sugerem uma maior susceptibilidade do sexo masculino a certos carcinógenos da fumaça do cigarro que induziriam, preferencialmente, mutações do *TP53*.

Semelhante aos resultados do estudo de Famulski et al. (2002), não observamos também nenhuma associação quanto ao gênero, quando os casos foram agrupados em p53-positivos e p53-negativos.

Em 41 dos 43 casos da amostra, foi possível fazer a comparação entre a graduação histológica de malignidade do fronte de invasão tumoral (GHM-FIT) e a imunomarcção para p53, segundo os critérios de Bryne et al. (1992). Este sistema de graduação provou ser útil prognosticamente, é rápido, tem uma boa confiabilidade inter e intraobservador, e provê informações sobre as relações tumor-hospedeiro (Bryne, 1998; Hogmo et al., 1999). Sawair et al. (2003) confirmaram essas vantagens do sistema em seu estudo, exceto pela concordância interobservador que não foi satisfatória em sua amostra.

Um dado interessante por nós observado foi que, dos casos classificados como pouco diferenciados, 60% (seis casos) ocorreram em língua, a maioria (5/6) mostrando positividade para p53. Somente a análise do gene *TP53* poderia esclarecer se esta positividade ou negatividade representa a presença da proteína normal ou mutada, embora, de acordo com a literatura, na maior parte dos casos haja mutação do gene. Outro estudo

encontrou resultados semelhantes aos nossos, porém o método de graduação histológica utilizado pelo autor foi o proposto por Anneroth e colaboradores, em 1987 (Guedes-Pinto 2000). Famulski et al. (2002) também observaram uma maior localização dos casos pouco diferenciados na língua e no assoalho bucal, embora sem significância estatística.

Alguns trabalhos (Stoll et al., 1998; Schoelch et al., 1999b) encontraram correlações entre alterações de p53 e a graduação histológica dos carcinomas epidermóides da cavidade bucal, através da observância de que estas alterações ocorriam com maior frequência nas lesões menos diferenciadas. Lam et al. (2000) observaram esta mesma tendência, porém sem relevância estatística.

Nossos resultados não demonstraram correlações significantes quando comparamos as médias de marcação para a p53 e a GHM-FIT, embora as lesões pouco diferenciadas tenham exibido a menor média de marcação (35%), quando comparadas com as bem (49,7%) e moderadamente (55,1%) diferenciadas. Warnakulasuriya & Johnson (1992) e Famulski et al. (2002) também não encontraram correlação de p53 com o grau de diferenciação do tumor. No entanto, em nosso estudo, o grau de diferenciação histológica foi avaliado apenas no fronte tumoral, não podendo, assim, ser comparada essa relação com estes estudos prévios. Por outro lado, em concordância com nossos achados, Horta (2003) não encontrou correlação entre graduação histológica e índice de marcação para p53 quando estas variáveis foram analisadas no fronte de invasão do tumor, embora os índices de marcação para a proteína nesta região tenham sido maiores do que em toda a extensão da neoplasia. Segundo o autor, o fronte de invasão é uma região composta por uma população de células diferenciadas das restantes da neoplasia, em razão do maior número de células que apresentam imunoreatividade para a p53 e, conseqüentemente, instabilidade genômica.

Da mesma forma, quando agrupamos os casos em p53-positivos e p53-negativos, as lesões menos diferenciadas foram as que mostraram o menor número de casos positivos para p53 (18,7% da amostra), contra 34,4% e 46,9% das bem e moderadamente diferenciadas, respectivamente.

Creemos que a divergência ocorrida, entre o nosso e os outros estudos, esteja baseada nos diferentes métodos empregados para análise da graduação histológica dos carcinomas. A maioria dos trabalhos (Yan et al., 1996; Guedes-Pinto, 2000; Lam et al., 2000) emprega outras classificações que consideram para a análise as células tumorais como um todo, e não somente aquelas do fronte de invasão tumoral.

Considerando, em conjunto, os resultados discrepantes dos trabalhos acima, o índice de marcação da p53 não parece guardar sempre relação direta com o grau de diferenciação celular.

7

Conclusões

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo, concluímos que:

1. Os diferentes sítios anatômicos da cavidade bucal não parecem diferir quanto aos mecanismos envolvendo a p53;
2. O padrão de imunomarcção da p53 no carcinoma epidermóide língua em comparação com os outros sítios, não se relacionou a maior agressividade do tumor nesse sítio, relatada na literatura;
3. A idade e o sexo dos pacientes parecem não ter influência sobre a imunomarcção da p53;
4. Não foi estabelecida uma relação direta entre a imunomarcção da p53 no tumor e o grau de diferenciação celular do fronte de invasão tumoral no carcinoma epidermóide da cavidade bucal.

8

Referências Bibliográficas

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLARCON-VARGAS, D. & RONAI, Z. p53-Mdm2 – the affair that never ends. **Carcinogenesis**, Oxford, v.23, n.4, p. 541-547, Apr. 2002.
2. ASHCROFT, M. & VOUSDEN, K.H. Regulation of p53 stability. **Oncogene**, Basingstoke, v. 18, n. 53, p. 7637-7643, Dec. 1999.
3. ATULA, S. et al. SSCP pattern indicative for p53 mutation is related to advanced stage and high-grade of tongue cancer. **Eur. J. Cancer B Oral Oncol.**, London, v. 32B, n. 4, p. 222-229, Jul. 1996.
4. AYRES, M.A. et al. Biostat. Versão 3.0. Belém: Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq, 2003. 292 p.
5. BADARACCO, G. et al. Overexpression of p53 and bcl-2 proteins and the presence of HPV infection are independent events in head and neck cancer. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, n. 4, p. 173-179, Apr. 2000.
6. BAKER, S. et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. **Science**, Washington, v. 249, n. 4971, p. 912-915, Aug. 1990.
7. BALMAIN, A. & HARRIS, C.C. Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 371-377, Mar. 2000.
8. BALZ, V. et al. Is the p53 inactivation frequency in squamous cell carcinomas of the head and neck underestimated? Analysis of p53 exons 2-11 and human papillomavirus 16/18 E6 transcripts in 123 unselected tumor specimens. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 63, n. 6, p. 1188-1191, Mar. 2003.
9. BÉROUD, C. & SOUSSI, T. p53 gene mutation: software and database. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 26, n. 1, p. 200-204, Jan. 1998.
10. BINKS, S. et al. p53 gene product expression in resected non-small cell carcinoma of the lung, with studies of concurrent cytological preparations and microwave antigen retrieval. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 50, n. 4, p. 320-323, Apr. 1997.
11. BOVA, R.J. et al. Cyclin D1 and p16ink4a expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 5, n.10, p. 2810-2819, Oct. 1999.

12. BRADLEY, G. et al. Abnormalities of the ARF-p53 pathway in oral squamous cell carcinoma. **Oncogene**, Basingstoke, v. 20, n. 5, p. 654-658, Feb. 2001.
13. BRENNAN, J. A. et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 332, n. 11, p. 712-717, Mar. 1995a.
14. BRENNAN, J. A. et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 332, n. 7, p. 429-435, Feb. 1995b.
15. BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Diseases**, Houndmills, v. 4, n. 2, p. 70-77, Jun. 1998.
16. BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.166, n. 4, p. 375-381, Apr. 1992.
17. BULLOCK, A.N. & FERSHT, A.R. Rescuing the function of mutant p53. **Nat. Rev. Cancer**, London, v.1, n.1, p. 68-76, Oct. 2001.
18. BURNS, J.E. et al. Maintenance of identical p53 mutations throughout progression of squamous cell carcinomas of the tongue. **Eur. J. Cancer B Oral Oncol.**, London, v. 30B, n. 5, p. 335-337, Sep. 1994.
19. CHEN, C.Y. et al. Interactions between p53 and mdm2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 91, n.7, p. 2684-2688, Mar. 1994.
20. COSTA, A.L.L. et al. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermóide oral. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v. 16, n.3, p. 216-220, jul-set. 2002.
21. COTRAM, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251 p.
22. CROSTHWAITE, N. et al. p53 protein expression in malignant, pre-malignant and non-malignant lesions of the lip. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 49, n. 8, p. 648-653, Aug.1996.
23. CRUZ, I. et al. Suprabasal p53 immunoreexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 55, n. 2, p. 98-104, Feb. 2002b.

24. CRUZ, I.B. et al. p53 immunoexpression in non-malignant oral mucosa adjacent to oral squamous cell carcinoma: potential consequences for clinical management. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.191, n. 2, p. 132-137, Jun. 2000.
25. CRUZ, I.B. et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.184, n. 4, p. 360-368, Apr. 1998.
26. CRUZ, I.B. et al. Specific p53 immunostaining patterns are associated with smoking habits in patients with oral squamous cell carcinomas. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 55, n. 11, p. 834-840, Nov. 2002a.
27. CULP, S.J. et al. A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 19, n.1, p. 117-124, Jan. 1998.
28. DE VRIES, A. et al. Targeted point mutations of p53 lead to dominant-negative inhibition of wild-type p53 function. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 99, n. 5, p. 2948-2953, Mar. 2002.
29. DIAS, F.L. et al. Elective neck dissection versus observation in stage I squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Rochester, v. 125, n. 1, p. 23-29, Jul. 2001.
30. DOWELL, S.P. & OGDEN, G.R. The use of antigen retrieval for immunohistochemical detection of p53 overexpression in malignant and benign oral mucosa: a cautionary note. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 60-64, Feb. 1996.
31. EICHELER, W. et al. Splicing mutations in TP53 in human squamous cell carcinoma lines influence immunohistochemical detection. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v. 50, n. 2, p. 197-204, Feb. 2002.
32. ERBER, R. et al. TP53 DNA contact mutations are selectively associated with allelic loss and have a strong clinical impact in head and neck cancer. **Oncogene**, Basingstoke, v. 16, n. 13, p. 1671-1679, Apr. 1998.
33. FAMULSKI, W. et al. p53 protein expression in oral squamous cell cancer in relation to some of its clinicopathological variables. **Folia Histochem. Cytobiol.**, Warszawa, v. 40, n. 2, p. 203-204, Jan. 2002.
34. FEARON, E.R. & VOGELSTEIN, B. Tumor supressor gene defects in human cancer. In: FREI, H. **Cancer Medicine**. 5th ed. London: BC Decker Inc,2000. Chap. 5, p. 67-87.

35. FRANÇA. International Agency for Research on Cancer (IARC). **IARC Cancer Epidemiology Database** [online]. Disponível em: <http://www-dep.iarc.fr/frontpage>. Acesso em: 08 out. 2003.
36. FREEDMAN, D. A. & LEVINE, A. J. Regulation of the p53 protein by the MDM2 oncoprotein – Thirty-eighth G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 59, n. 1, p. 1-7, Jan. 1999.
37. FRIEDRICH, R.E. et al. p53-mutation in smears of oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res.**, Athens, v. 20, n. 6D, p. 4927-4930, Nov. 2000.
38. GIOVANINI, A.F. **Uso da técnica imuno-histoquímica e PCR-SSCP para estudo do p53 em carcinomas epidermóides de boca**. São Paulo, 2001. 97p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
39. GLUCKMAN, J.L. et al. Prognostic indicators for squamous cell carcinoma of the oral cavity: a clinicopathologic correlation. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 107, n.9, p. 1239-1244, Sept. 1997.
40. GONZALEZ-MOLES, M.A. et al. p53 protein expression in oral squamous cell carcinoma – Survival Analysis. **Anticancer Res.**, Athens, v. 21, n. 4B, p. 2889-2894, Jul. 2001.
41. GONZALEZ-MOLES, M.A. et al. Importance of tumour thickness measurement in prognosis of tongue cancer. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 394-397, Jun. 2002a.
42. GONZALEZ-MOLES, M.A. et al. Significance of p53 expression in non-tumoral epithelium adjacent to oral squamous cell carcinomas. **J. Laryngol. Otol.**, London, v. 116, n. 5, p. 355-358, May 2002b.
43. GOODSSELL, D.S. The molecular perspective: p53 tumor supressor. **Oncologist**, Dayton, v. 4, n. 2, p. 138-139, Apr. 1999.
44. GRAU, J.J. et al. Multidisciplinary approach in advanced câncer of the oral cavity: outcome with neoadjuvant chemotherapy according to intention-to-treat local therapy. **Oncology**, Basel, v. 63, n. 4, p. 338-345, Jan. 2002.
45. GUEDES-PINTO, R. **Marcação imunohistoquímica para p53 em carcinoma epidermóide de lábio, língua e mucosa jugal**. São Paulo, 2000. 76p. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
46. GUENGERICH, F.P. Metabolism of chemical carcinogens. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n.3, p. 345-351, Mar. 2000.

47. HAAS, S.; HÖRMANN, K.; BOSCH, F.X. Expression of cell cycle proteins in head and neck cancer correlates with tumor site rather than tobacco use. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 618-623, Sep. 2002.
48. HAINAUT, P. et al. IARC database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 26, n. 1, p. 205-213, Jan. 1998.
49. HAUPT, I. et al. Deconstruction of p53 functions and regulation. **Oncogene**, Basingstoke, v. 21, n. 54, p. 8223-8231, Nov. 2002.
50. HOGMO, A. et al. Predictive value of malignancy grading systems, DNA content, p53, and angiogenesis for stage I tongue carcinomas. **J. Clin. Pathol.**, London, v. 52, n. 1, p. 35-40, Jan.1999.
51. HOLLSTEIN, M. et al. p53 mutations in human cancers. **Science**, Washington, v. 253, n. 5015, p. 49-53, Jul. 1991.
52. HORTA, M.C.R. **Imunolocalização das proteínas p53, p21 e mdm2 em carcinoma epidermóide de lábio**. Belo Horizonte, 2003. 160p. Tese (Doutorado em Anatomia Patológica Odontológica) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.
53. HSIEH, L. et al. Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 22, n.9, p. 1497-1503, Sep. 2001.
54. ISRAELS, E.D. & ISRAELS, L.G. The cell cycle. **Oncologist**, Dayton, v. 5, n. 6, p. 510-513, Dec. 2000.
55. ITO, T. et al. Expression of heat shock proteins in squamous cell carcinoma of the tongue: an immunohistochemical study. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 27, n. 1, p. 18-22, Jan. 1998.
56. KANNAN, S. et al. Infrequent loss of heterozygosity of the major tumour supressor genes in Indian oral cancers. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 31, n. 4, p. 414-418, Aug. 2001.
57. KERDPON, D.; RICH, A.M.; READE, P.C. Expression of p53 in oral mucosal hyperplasia, dysplasia and squamous cell carcinoma. **Oral Diseases**, Houndmills, v. 3, n.2, p. 86-92, Jun. 1997.

58. KHADEMI, B. et al. The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. **Cancer Lett.**, Virginia, v. 184, n. 2, p. 223-230, Oct. 2002.
59. KOCH, W.M. et al. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. **Laryngoscope**, St. Louis, v. 109, n.10, p. 1544-1551, Oct. 1999.
60. KOSINSKA, W.; VON PRESSENTIN, M.; GUTTENPLAN, J.B. Mutagenesis induced by benzo[a]pyrene in *lacZ* mouse mammary and oral tissues: comparisons with mutagenesis in other organs and relationship to previous carcinogenicity assays. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 20, n.6, p. 1103-1106, Jun. 1999.
61. KROPVELD, A. et al. Sequencing analysis of RNA and DNA of exons 1 through 11 shows p53 gene alterations to be present in almost 100% of head and neck squamous cell cancers. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 79, n. 3, p. 347-353, Mar. 1999.
62. KUSAMA, K. et al. p53 gene alterations and p53 protein in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **J. Pathol.**, Edinburgh, v. 178, n. 4, p. 415-421, Apr. 1996.
63. LA VECCHIA, C. et al. Epidemiology and prevention of oral cancer. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 33, n.5, p. 302-312, Sep. 1997.
64. LAM, K.Y. et al. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinomas: clinicopathological relevance and correlation with p53 expression. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, n. 4, p. 167-172, Apr. 2000.
65. LAVIEILLE, J.P. et al. Immunohistochemical detection of p53 protein in preneoplastic lesions and squamous cell carcinoma of the head and neck. **Acta Otolaryngol.**, Stockholm, v. 115, n. 2, p. 334-339, Mar. 1995.
66. LIAO, P.H. et al. Mutation of p53 gene codon 63 in saliva as a molecular marker for oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 36, n. 3, p. 272-276, May 2000.
67. MA, L. et al. Clinical implication of screening p53 gene mutations in head and neck squamous cell carcinomas. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, Berlin, v. 124, n. 7, p. 389-396, July. 1998.
68. MALUMBRES, M. & BARBACID, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 1, n. 3, p. 222-231, Dec. 2001.
69. MAY, P. & MAY, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene**, Basingstoke, v. 18, n. 53, p. 7621-7636, Dec. 1999.

70. MCNICOL, A.M. & RICHMOND, J.A. Optimizing immunohistochemistry: antigen retrieval and signal amplification. **Histopathology**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 97-103, Feb. 1998.
71. MICHAEL, D. & OREN, M. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. **Semin. Cancer Biol.**, Philadelphia, v. 13, n.1, p. 49-58, Feb. 2003.
72. MINAMOTO, T.; MAI, M.; RONAI, Z. Environmental factors as regulators and effectors of multistep carcinogenesis. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 519-527, Apr. 1999.
73. NAGLER, R.M. Molecular aspects of oral cancer. **Anticancer Res.**, Athens, v. 22, n. 5, p. 2977-2980, Sept. 2002.
74. NAGLER, R.M. et al. Squamous cell carcinoma of the tongue: the prevalence and prognostic roles of p53, Bcl-2, c-erbB-2 and apoptotic rate as related to clinical and pathological characteristics in a retrospective study. **Cancer Lett.**, Virginia, v. 186, n. 2, p. 137-150, Dec. 2002.
75. NEVILLE, B.W. & DAY, T.A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v. 52, n. 4, p. 195-215, July-Aug. 2002.
76. NG, I.O. et al. Expression of p21/Waf1 in oral squamous cell carcinomas – correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 63-69, Jan. 1999.
77. NYLANDER, K.; DABELSTEEN, E.; HALL, P.A. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 29, n. 9, p. 413-425, Oct. 2000.
78. O-CHAROENRAT, P. et al. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 39, n. 4, p. 386-390, Jun. 2003.
79. ODA, Y. et al. Molecular abnormalities of p53, MDM2, and H-ras in synovial sarcoma. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v. 13, n. 9, p. 994-1004, Sept. 2000.
80. ONIZAWA, K. et al. Factors associated with diagnostic delay of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 39, n. 8, p. 781-788, Dec. 2003.
81. OSTWALD, C. et al. p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. **Int. J. Cancer**, New York, v. 88, n. 1, p. 82-86, Oct. 2000.

82. PARKIN, M.D.; PISANI, P.; FERLAY, J. Global cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v. 49, n. 1, p. 33-64, Jan-Feb. 1999.
83. PARTRIDGE, M. et al. New insights into p53 protein stabilisation in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 45-55, Jan. 1999.
84. PERERA, F.P. & WEINSTEIN, I.B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n.3, p. 517-524, Mar. 2000.
85. PFEIFER, G.P. et al. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. **Oncogene**, Basingstoke, v. 21, n. 48, p. 7435-7451, Oct. 2002.
86. PIFFKÓ, J. et al. Expression of p53 protein in oral squamous cell carcinomas and adjacent non-tumorous mucosa of the floor of the mouth: an archival immunohistochemical study using wet autoclave pretreatment for antigen retrieval. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 24, n. 8, p. 337-342, Sep. 1995.
87. PIFFKÓ, J. et al. Molecular assessment of p53 abnormalities at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. **Head Neck**, New York, v. 20, n. 1, p. 08-15, Jan. 1998.
88. POIRIER, M.C.; SANTELLA, R.M.; WESTON, A. Carcinogen macromolecular adducts and their measurement. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n.3, p. 353-359, Mar. 2000.
89. QIAN, H. et al. Groups of p53 target genes involved in specific p53 downstream effects cluster into different classes of DNA binding sites. **Oncogene**, Basingstoke, v. 21, n. 51, p. 7901-7911, Nov. 2002.
90. REGEZI, J.A. et al. p53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasias and in situ carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 24, n. 1, p. 18-22, Jan. 1995.
91. REGEZI, J.A. et al. p53, p21, Rb, and Mdm2 proteins in tongue carcinoma from patients <35 versus >75 years. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, n.4, p. 379-383, Jul. 1999.
92. SANDAL, T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. **Oncologist**, Dayton, v. 7, n.1, p. 73-81, Feb. 2002.
93. SAUNDERS, M.E. et al. Patterns of p53 gene mutations in head and neck cancer: full-length gene sequencing and results of primary radiotherapy. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 5, n. 9, p. 2455-2463, Sept. 1999.

94. SAWAIR, F.A. et al. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 01-09, Jan. 2003.
95. SCHOELCH, M.L. et al. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 77-85, Jan. 1999a.
96. SCHOELCH, M.L. et al. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 333-342, May 1999b.
97. SCHWARTZ, J.L. et al. Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 225-235, Mar. 2000.
98. SCULLY, C. & PORTER, S. Oral cancer. **BMJ**, London, v. 321, n. 7253, p. 97-100, Jul. 2000.
99. SHAHNAVAZ, S.A. et al. p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.190, n. 4, p. 417-422, Mar. 2000.
100. SIDRANSKY, D. Emerging molecular markers of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 2, n. 3, p. 210-219, Mar. 2002.
101. SITTEL, C. et al. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, n. 6, p. 583-589, Nov. 1999.
102. SONI, S. et al. Coexpression of Ets-1 and p53 in oral carcinomas is associated with P-glycoprotein expression and poor prognosis. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, Berlin, v. 128, n. 6, p. 336-342, Apr. 2002.
103. SORENSEN, D.M. et al. Absence of p53 mutations in squamous carcinomas of the tongue in nonsmoking and nondrinking patients younger than 40 years. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, Rochester, v. 123, n.5, p. 503-506, May 1997.
104. STOLL, C.; BARETTON, G.; LÖHRS, U. The influence of p53 and associated factors on the outcome of patients with oral squamous cell carcinoma. **Virchows Arch.**, Berlin, v. 433, n. 5, p. 427-433, Nov. 1998.
105. SZYMAŃSKA, K. & HAINAUT, P. TP53 and mutations in human cancer. **Acta Biochim. Pol.**, Warsaw, v. 50, n. 1, p. 232-238, Jan. 2003.

106. TAN, L.K.S.; DOWELL, S.P.; OGDEN, G.R. Antigen retrieval: p53 staining in benign, pre-malignant and malignant tissues of the larynx. **Clin. Otolaryngol.**, Oxford, v. 21, n. 2, p. 147-150, Apr. 1996.
107. TSENG, J.E. et al. Gender differences in p53 mutational status in small cell lung cancer. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 59, n. 22, p. 5666-5670, Nov. 1999.
108. TSURUSAKO, S. et al. Low incidence of p53 mutations in well-differentiated tongue squamous cell carcinoma in Japan. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, Tokyo, v. 32, n. 9, p. 327-331, Sep. 2002.
109. ÜNAL, O.F.; AYHAN, A.; HOŞAL, A.S. Prognostic value of p53 expression and histopathological parameters in squamous cell carcinoma of oral tongue. **J. Laryngol. Otol.**, London, v. 113, n. 5, p. 446-450, May 1999.
110. URIST, O.F et al. Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: analysis of prognostic factors. **Am. J. Surg.**, New York, v. 154, n. 4, p. 411-414, Oct. 1987.
111. VAN HOUTEN, V.M.M. et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 6, n. 10, p. 3803-3816, Oct. 2000.
112. VAN OIJEN, M.G.C.T. & SLOOTWEG, P.J. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 6, n. 6, p. 2138-2145, Jun. 2000a.
113. VAN OIJEN, M.G.C.T. & SLOOTWEG, P.J. Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits ? **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Baltimore, v. 9, n. 3, p. 249-256, Mar. 2000b.
114. VON PRESSENTIN, M.; KOSINSKA, W.; GUTTENPLAN, J.B. Mutagenesis induced by oral carcinogens in *lacZ* mouse (MutaTMMouse) tongue and other oral tissues. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 2167-2170, Nov. 1999.
115. VOUSDEN, K.H. Activation of the p53 tumor suppressor protein. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1602, n. 1, p. 47-59, Mar. 2002.
116. WALKER, D.R. et al. Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. **Oncogene**, Basingstoke, v.18, n. 1, p. 211-218, Jan. 1999.
117. WARNAKULASURIYA, K. A. & JOHNSON, N.W. Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 21, n. 9, p. 404-408, Oct. 1992.

118. WILLIAMS, H.K. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. **Mol. Pathol.**, London, v. 53, n. 4, p. 165-172, Aug. 2000.
119. WÜNCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 38, n. 8, p. 737-746, Dec. 2002.
120. WÜRL, P. et al. Prognostic value of immunohistochemistry for p53 in primary soft-tissue sarcomas: a multivariate analysis of five antibodies. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, Berlin, v. 123, n. 9, p. 502-508, Sept. 1997.
121. XIE, X. et al. The prognostic value of spontaneous apoptosis, bax, bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. **Cancer**, Philadelphia, v. 86, n. 6, p. 913-920, Sep. 1999.
122. YAMAZAKI, Y. et al. Specific p53 mutations predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 39, n. 2, p. 163-169, Feb. 2003.
123. YAN, J.J.; TZENG, C.C.; JIN, Y.T. Overexpression of p53 protein in oral squamous cell carcinoma of buccal mucosa and tongue in Taiwan: an immunohistochemical and clinicopathological study. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 55-59, Feb. 1996.
124. YANAMOTO, S. et al. Expression of p53R2, newly p53 target in oral normal epithelium, epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **Cancer Lett.**, Virginia, v. 190, n. 2, p. 233-243, Feb. 2003.
125. YANAMOTO, S. et al. p53, Mdm2 and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 94, n.5, p. 593-600, Nov. 2002.
126. YAO, L.; IWAI, M.; FURUTA, I. Correlations of bcl-2 and p53 expression with the clinicopathological features in tongue squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 56-62, Jan. 1999.
127. YUSPA, S.H. Overview of carcinogenesis: past, present and future. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 341-344, Mar. 2000.
128. ZAKRZEWSKA, J.M. Fortnightly review: oral Cancer. **BMJ**, London, v. 318, n. 7190, p. 1051-1054, Apr. 1999.