

<p>Daniela Cotta Ribeiro</p>	<p>Daniela Cotta Ribeiro</p>
<p>Avaliação imunohistoquímica</p>	<p>Avaliação imunohistoquímica do EGFR / Her -1 em leucoplasias bucais</p>
<p>2009</p>	<p>Faculdade de Odontologia Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte 2009</p>

Daniela Cotta Ribeiro

Avaliação imunoistoquímica do EGFR / Her -1 em leucoplasias bucais

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

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Belo Horizonte

Faculdade de Odontologia da UFMG

2009

R 484a Ribeiro, Daniela Cotta
2009 Avaliação imunoistoquímica do EGFR/Her-1 em leucopla-
T sias bucais / Daniela Cotta Ribeiro
76fls.: il.
Orientadora: Maria Cássia Ferreira de Aguiar
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia
1. Genes C-erbB-1 – Teses 2. Leucoplasia Bucal – Teses
I. Aguiar, Maria Cássia Ferreira de II. Universidade Federal
de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia III. Título.

BLACK D047

Aos meus pais Mazzarello e Mozart, pela minha formação, apoio, estímulo e presença constantes. Aos meus irmãos Thiago, Mateus e Leonardo pelo apoio e torcida em todos os momentos.

Agradecimentos

À Deus, por mais uma etapa cumprida e mais um sonho realizado.

À minha família, sem ela nada disso teria acontecido.

Ao lácones, pelo carinho, paciência e incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar pelo exemplo de competência e profissionalismo e pela dedicação e incentivo a mim dedicados, principalmente nos momentos mais difíceis da minha formação.

Aos professores Maria Auxiliadora Vieira do Carmo, Ricardo Alves de Mesquita, Tarcília Aparecida da Silva, Ricardo Santiago Gomez e Vagner Santos pelos valiosos ensinamentos.

Ao professor Mauro Henrique Nogueira Guimarães de Abreu, pela grande ajuda com a parte estatística do trabalho.

Aos alunos de iniciação científica, Frederico e Sílvia pela ajuda e amizade.

Aos colegas de pós-graduação, em especial Francisco, Adriana, Aline, Jeane, Renata, Patrícia, Vanessa, Anacélia, Giovana, Juliana, Elizete e Augusto pelo companheirismo e amizade.

Aos colegas da Biologia molecular Paula, Cláudia, Fabiano, João, Carolina, Carolina, Fabrício, Michelle e Marina pela agradável convivência.

Aos funcionários do laboratório Inês e Heloísa pela constante disponibilidade em nos ajudar.

Ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia pela ajuda e orientação.

A todos os amigos que me ajudaram nessa conquista.

Prefácio

Este trabalho é resultado de uma pesquisa desenvolvida no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG, coordenada pela Professora Doutora Maria Cássia Ferreira de Aguiar. Foi estruturado de modo a conter uma breve introdução, revisão de literatura, metodologia e resultados, discussão, conclusão e, em anexo, o artigo científico redigido a partir dessa pesquisa.

Sumário

Prefácio	i
Sumário	ii
Lista de tabelas e quadros	iv
Lista de figuras	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
Resumo	viii
Abstract	ix
1) Introdução	1
2) Revisão de literatura	4
2.1) Leucoplasias	5
2.2) EGFR e leucoplasias	11
2.3) Proliferação celular	13
3) Objetivos	18
3.1) Objetivo geral	19
3.2) Objetivos específicos	19
4) Justificativa	20
5) Metodologia	22
5.1) Obtenção da amostra e seleção dos casos	23
5.2) Técnica de imunistoquímica	25

5.3) Análise da imunomarcção	27
5.4) Análise estatística	29
5.5) Aspectos éticos e legais	29
6) Resultados	30
6.1) Caracterização da amostra	31
6.2) Análise descritiva da imunomarcção	31
7) Discussão	37
8) Conclusões	48
9) Referências bibliográficas	50
10) Anexos	58
10.1) Caracterização da amostra quanto ao gênero, atipia, tabagismo, localização e idade	59
10.2) Caracterização da amostra quanto à imunomarcção para o EGFR, Ki-67 e p27	61
10.3) Aprovação no COEP	63
10.4) Artigo	64

Lista de tabelas e quadros

Tabela 1 – Anticorpos primários empregados e seus respectivos tratamentos para a recuperação antigênica, diluição, tempo e temperatura de incubação ----	
-----	27
Tabela 2 - Associação da imunoexpressão do EGFR com tabagismo, localização, graduação histológica e proliferação celular -----	34
Tabela 3 – Valores médios para o Ki-67 total e em cada estrato epitelial em relação aos diferentes graus de atipia epitelial -----	36
Tabela 4 – Valores médios para o p27 total e em cada estrato epitelial em relação aos diferentes graus de atipia epitelial -----	36
Quadro 1 – Características histológicas de atipia epitelial -----	24
Quadro 2 – Graduação histológica das leucoplasias -----	24

Lista de figuras

Figura 1A – Cortes histológicos de atipia moderada, mostrando projeções epiteliais em forma de gota (HE, 414X) -----33

Figura 1B – Expressão imunoistoquímica do EGFR, pela Streptoavidina-biotina (215X) -----33

Figura 1C – Expressão imunoistoquímica do Ki-67, pela Streptoavidina-biotina (215X), apresentando imunomarcção restritas à camada basal e parabasal ----
-----33

Figura 1D – Expressão imunoistoquímica do p27, pela Streptoavidina-biotina (214X), apresntando imunomarcção positiva para as camadas mais superiores do epitélio -----33

Lista de Abreviaturas e Siglas

cAMP - Adenosina monofosfato cíclico

CCE - Carcinoma de células escamosas

CCEB - Carcinoma de células escamosas de boca

CDK - Quinase dependente de ciclina

CDKI - Inibidor das quinases dependentes de ciclina

Cox-2 - Ciclooxygenase 2

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa

DMBA - Tetrahydrocloridrato de diaminobenzidina

EGFR - Receptor do fator de crescimento epitelial (*Epithelial growth factor receptor*)

FOUFMG – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais

GST - Glutathione S-Transferase

HE - Hematoxilina e eosina

HFI - Hiperplasia fibrosa inflamatória

HPV - Papiloma vírus humano

Ki-67 - Antígeno Ki-67

KiBPerc - Percentual de células basais positivas para o Ki-67

KiPbPerc - Percentual de células parabasais positivas para o Ki-67

KiSbPerc - Percentual de células suprabasais positivas para o Ki-67

KiTPerc - Percentual total de células positivas para o Ki-67

MA - Macrófagos alveolares

p27 - Antígeno p27

p27BPerc - Percentual de células basais positivas para o p27

p27PbPerc - Percentual de células parabasais positivas para o p27

p27SbPerc - Percentual de células suprabasais positivas para o p27

p27TPerc - Percentual do total de células positivas para o p27

PGE2 - Prostaglandina E2

PKA – Proteína quinase A

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

Tris HCl - Hidroxi-metil-aminometano- ácido clorídrico

Tris/ EDTA - Hidroximetil-aminometano / ácido etileno diamino tetra acético

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

uPA - Ativador plasmogênico tipo uroquinase (*urokinase-type plasminogen activator*)

χ^2 - Teste qui-quadrado de Pearson

Resumo

A leucoplasia é a principal lesão cancerizável da boca. Fatores como a localização das lesões, hábito de tabagismo e atipia histológica têm sido associados ao potencial de transformação maligna dessas lesões, até o momento, no entanto, sem resultados definitivos. O EGFR é uma proteína de transmembrana, receptora de fatores de crescimento e com atividade tirosina quinase, pertencente à família dos receptores c-erbB. A expressão aumentada da proteína está relacionada com a progressão de tumores epiteliais, entre outras formas, através da alteração na proliferação celular. A proteína Ki-67 é um antígeno nuclear expressado em células proliferativas, muito utilizado como marcador de proliferação celular. A p27 é uma proteína com ação CDKI (inibidor das quinases dependentes de ciclina), que atua na inibição do ciclo celular. O objetivo do trabalho foi avaliar a associação da imunoexpressão do EGFR com atipia epitelial, tabagismo, localização das leucplasias e com a expressão de Ki-67 e p27. Avaliou-se ainda a associação entre a proliferação celular avaliada pelo Ki-67 e p27 com a atipia epitelial. Quarenta e oito lesões diagnosticadas como leucoplasias foram recuperadas do arquivo do laboratório de Patologia Bucal da FO-UFMG. As lâminas foram revisadas e dados clínicos (gênero, localização e tabagismo) recuperados. A imunoexpressão do EGFR mostrou associação positiva com a localização e com o total de célula positivas para p27. Não foi encontrada associação entre o EGFR e os demais dados clínico patológicos. Conclui-se que o EGFR está expresso em grande parte das leucoplasias bucais avaliadas independentemente do grau histológico de atipia. Os casos positivos para o EGFR foram localizados, em sua maioria, nas regiões de alto risco. As associações encontradas entre EGFR, localização das lesões e p27 devem ser melhor investigadas.

Abstract

Leukoplakia is the most common precancerous lesion of the oral cavity. The presence of epithelial dysplasia and clinical characteristics such as tobacco consumption and location are important predicting factors of malignant transformation. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is a member of a family of tyrosine-kinase receptor that plays an important role in the control of cell growth. A high expression of EGFR is frequently observed in many solid tumors including Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC). The aim of the present study was to evaluate the immunoexpression of EGFR on 48 oral leukoplakias searching the association of EGFR with tobacco consumption, location (high/low risk), grade of epithelial dysplasia, and cell proliferation through immunohistochemistry for Ki-67 and p27. EGFR was positive in 62,5% of leukoplakias. EGFR immunoexpression showed a significant difference between leukoplakias of high and low risk sites. p27 immunoexpression was also significantly different between positive and negative EGFR leukoplakias. The p27 index lowered with the severity of dysplasia. We did not find an association of EGFR with tobacco and Ki-67 immunoexpression. The results show that EGFR is expressed in leukoplakias independently of dysplasia. The association of EGFR and p27 merits further investigation.

1) Introdução

A leucoplasia bucal é uma placa branca na mucosa bucal, que não pode ser caracterizada como qualquer outra doença, sendo a principal lesão potencialmente maligna da boca (Bouquot e Whitaker, 1994) e considerada como um importante precursor de carcinoma de células escamosas (IARC, 2003).

O receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR ou Her-1) é uma proteína transmembrana, receptora de fatores de crescimento e com atividade tirosina quinase. Alterações do Her-1 têm sido associadas ao desenvolvimento e progressão de diversos carcinomas, incluindo o de boca (Galizia et al., 2006; Tsao et al., 2007). A amplificação do gene e a expressão aumentada da proteína já foram descritas em leucoplasias bucais permitindo especulações sobre a participação do EGFR no processo de transformação maligna (Shin et al., 1994; Werkmeister e Brandt., 1999; Nagatsuka et al., 2001). A ativação do domínio tirosina-quinase do EGFR pelos seus ligantes promove diversas vias de transição associadas ao desenvolvimento tumoral, no entanto, não se sabe ainda através de qual mecanismo o EGFR participa da carcinogênese bucal. Neste trabalho hipotetizou-se que esta ação nas fases iniciais da carcinogênese bucal se dá principalmente através da desregulação da proliferação celular, envolvendo proteínas reguladoras do ciclo celular (Kövesi e Szende, 2006). Além disso, a associação do EGFR a alguns fatores considerados importantes no processo de transformação maligna das leucoplasias também foi investigado.

O Ki-67 é um marcador de proliferação celular que se expressa no núcleo, estando ausente na fase G₀, apresentando-se fracamente na fase G₁ e mais intensamente nas demais fases do ciclo celular (Girod et al., 1998; Liu et al., 2000; Özdemir et al., 2001).

A p27 é uma das proteínas de ação CDKI (inibidor das quinases dependentes de ciclina), pertencente à família KIP/CIP (Ling et al., 2007; Zhu et al., 2007) que participa da inibição do ciclo celular evitando que a célula entre na fase G₁ (Tsuzuki et al., 2003; Lee et al., 2007 B).

O presente trabalho apresenta como objetivo geral a avaliação da expressão do EGFR em leucoplasias bucais pela técnica da imunistoquímica, verificando a associação desta expressão com o tabagismo, localização, grau de atipia epitelial e proliferação celular pela imunistoquímica das proteínas Ki-67 e p27.

2) Revisão de literatura

2.1) Leucoplasias

A leucoplasia é uma lesão potencialmente maligna descrita por Paget em 1870, inicialmente denominada de forma genérica de ictiose, placa do fumante ou leucoqueratose. Só em 1877 foi introduzido, por Schwinner, o termo leucoplasia (Tradati et al., 1997; Warnakulasuriya et al., 2008).

Atualmente o diagnóstico de leucoplasia é feito por um critério de exclusão. A doença é definida como placa ou mancha branca não destacável, que não pode ser diagnosticada como outra lesão (Bouquot e Whitaker, 1994; Tradati et al., 1997; Liu e Klein-Szanto, 2000; De Paula e Gomez, 2001; Braakhuis et al., 2004; Lee et al., 2006; Greer, 2006; Tsao et al., 2007).

A hipótese de que a leucoplasia apresenta uma natureza potencialmente maligna surgiu em função da observação de áreas leucoplásicas próximas a carcinomas, além da presença de epitélio displásico e regiões microinvasivas em algumas biópsias de leucoplasias (Bouquot e Whitaker, 1994). Atualmente as leucoplasias são reconhecidas como potenciais precursores do carcinoma de células escamosas apresentando grande chance de progressão para esse tipo de neoplasia (Holmstrup et al., 2006; Hsue et al., 2007; Duarte et al., 2008).

Os CCEB (carcinoma de células escamosas de boca) têm origem a partir de um processo de múltiplas etapas envolvendo o acúmulo de mutações genéticas relacionadas tanto à proliferação quanto à diferenciação celular em um epitélio normal (Epstein et al., 2002). Sendo assim, é aceito que alguns dos cânceres de boca evoluem a partir de uma leucoplasia pré-existente (Reibel, 2003; Brown e Kane, 2006; Lee et al., 2007 A; Hsue et al., 2007; Montebugnoli et al., 2008).

Não há um consenso na literatura sobre qual a real estimativa em relação à capacidade de transformação maligna das leucoplasias. Liu e Klein-Szanto (2000) sugerem que essa transformação varia de 5% a 43%, Tsuzuki et al. (2003) sugerem de 0% a 36%, García et al. (2005) de 2% a 36%, Hsue et al. (2007) de 16% a 62%, Thomson et al. (2008) de 6% a 36%, entre outros

autores. Essa variabilidade entre os autores pode estar relacionada a diferenças entre as amostras de cada trabalho, desde as quantitativas a aquelas associadas à localização das lesões, tipo clínico e hábitos de tabagismo.

Os trabalhos sobre leucoplasia na literatura mostram ampla faixa etária em relação ao perfil dos pacientes que desenvolvem a doença (Bouquot e Whitaker, 1994; Greer, 2006). Essa diferença varia de acordo com a característica da amostra, objetivo da avaliação e fatores de risco estudados (Kleinman et al., 1991; Kleinman et al., 1993). No entanto, a revisão de literatura feita por Bouquot e Whitaker (1994) descreve que a principal população acometida pela leucoplasia apresenta-se acima dos 40 anos de idade, aumentando progressivamente com o aumento da idade, principalmente no gênero masculino. De acordo com os autores, dificilmente essa lesão se desenvolve em indivíduos abaixo de 30 anos. Greer (2006) também atribuiu a maior prevalência da lesão ao gênero masculino, acima dos 40 anos. Considera-se que leucoplasias que se desenvolvem em mulheres tendem a apresentar um curso mais grave (Van der Waal et al., 1997).

As leucoplasias podem se apresentar sob vários aspectos clínicos, sendo denominadas de homogêneas ou não-homogêneas (Van der Waal et al., 2000; Reibel, 2003). As leucoplasias homogêneas são aquelas que exibem uma superfície totalmente branca, de textura lisa ou verrucosa (Bouquot e Whitaker, 1994; Van der Waal et al., 2000). As leucoplasias não homogêneas apresentam componentes brancos e eritematosos, podendo apresentar também superfície nodulares ou verrucosas (Van der Waal et al., 2000; Reibel, 2003).

A leucoplasia verrucosa é uma forma específica de leucoplasia, descrita por Hansen et al. (1985), apresenta uma textura verrucosa, coloração branca podendo, às vezes, apresentar componente eritematoso. Apesar do grau de atipia variável, exibe alta taxa de recorrência em tratamentos conservadores e alta taxa de malignização (Van der Waal et al., 2000; Bagán et al., 2004; Greer, 2006; Cabay, et al., 2007). Apesar de lento, a progressão das leucoplasias

verrucosas leva a um crescimento da lesão tanto vertical, quanto horizontal, podendo, eventualmente, adquirir um aspecto mais exofítico, granular ou verruciforme (Cabay et al., 2007).

As leucoplasias podem se desenvolver em qualquer região da boca, no entanto de acordo com o local de surgimento, é classificada como sendo de alto ou baixo risco. São consideradas regiões de alto risco aquelas localizadas em língua e no soalho bucal e de baixo risco nas demais regiões (Bouquot e Whitaker, 1994; Schepman e Van der Waal, 1995; Van der Waal et al., 1997; Liu e Klein-Szanto, 2000; Van der Waal et al., 2000; Zhang et al., 2001; Reibel, 2003; Greer, 2006; Lee et al., 2006). No entanto, de acordo com a população estudada, os costumes da região e fatores etiológicos para as lesões, outras localizações podem ser consideradas como alto risco de malignidade como lábio (Bouquot e Whitaker, 1994), trígono retromolar e palato mole (Zhang et al., 2001) e mucosa jugal (Van der Waal et al., 2000). Zhang et al. (2001) descreveram em seu trabalho que leucoplasias em regiões de alto risco apresentam maior quantidade de células atípicas, maior porcentagem de malignização e que essas regiões são ainda as de maior ocorrência dos CCEB quando comparadas às regiões de baixo risco. Os autores concluíram que as regiões de alto e baixo risco apresentaram diferentes percentuais de perda de heterozigose. Esta alteração genética está mais presente nas regiões de alto risco, relacionando, então, essa localização à maior chance de progressão para um carcinoma. Scully e Porter (2007) também descreveram a língua e soalho bucal como sendo as regiões mais frequentes no desenvolvimento do CCEB. Os autores ainda sugeriram que a avaliação clínica da cavidade bucal não deve ser feita apenas de forma visual mas sim por cuidadosa palpação das estruturas anatômicas, principalmente nessas duas localizações.

Embora a leucoplasia tenha sido descrita clinicamente por volta de 1870, as alterações histológicas relacionadas a ela foram descritas apenas em 1936 por McCarthy (Tradati et al., 1997). Histologicamente as leucoplasias são denominadas hiperkeratoses e classificadas de acordo com o grau de acometimento celular. São classificadas como hiperkeratose na ausência de atipia celular ou como atipia discreta, moderada ou severa na presença de

alterações celulares (Greer, 2006). As alterações individuais das células são denominadas atipia celular (Reibel, 2003) sendo o termo displasia epitelial usado para se referir ao conjunto de alterações histopatológicas sem, no entanto, relacionar-se com alteração na aparência clínica da lesão (Greer, 2006). Dentre as alterações celulares observadas num epitélio displásico, estão o hiperchromatismo nuclear, inversão e perda de polarização das células da camada basal, pleomorfismos, alteração de estratificação e alteração na proporção núcleo / citoplasma (Hsue et al., 2007).

A atipia epitelial é aceita por muitos autores como o principal preditor de malignidade, ainda que as alterações histológicas nem sempre levem a alterações clínicas no epitélio (Greer, 2006). Hsue et al. (2007) sugeriram que o principal fator associado ao prognóstico das leucoplasias é a graduação histológica, principalmente na presença de atipia moderada ou severa.

No entanto a graduação histológica como preditor de malignidade é um ponto controverso. No trabalho de Holmstrup et al. (2007), não foi encontrada relação entre o surgimento de CCEB e os diversos graus de displasia epitelial. A análise das biópsias incisionais mostrou que a presença de carcinoma *in situ*, qualquer grau de atipia epitelial versus ausência de displasia não mostrou associação com a progressão maligna das lesões. Os autores sugeriram que essa diferença entre os trabalhos pode se dar em função da quantidade de material disponível para análise microscópica e que biópsias incisionais podem não ser representativas da lesão. Além disso, a própria análise histológica é uma questão subjetiva. Lee et al. (2007 A) também consideraram que a análise da biópsia incisional, comparada com a análise de toda a peça cirúrgica, apresenta limitações que se refletem na graduação histológica. Porém, ponderam que a biópsia excisional, dependendo dos achados histológicos, pode deixar de ser um exame simples e se tornar um sobretratamento para lesões benignas ou um subtratamento para lesões malignas.

Embora muitas vezes idiopática, o desenvolvimento das leucoplasias pode estar relacionado a alguns fatores etiológicos como consumo do tabaco, etilismo, pasta de betel, alterações genéticas, presença de candidíase e do

HPV (papiloma vírus humano) (Bouquot e Whitaker,1994; Saito et al.,1999; Reibel, 2003; Hashib et al., 2003; Lee et al., 2006; Greer, 2006; Brown e Kane, 2006; Tsao et al., 2007).

As alterações genéticas associadas ao surgimento e progressão das leucoplasias são de extrema importância e atualmente têm sido muito estudadas. Já são conhecidos alguns genes que, quando alterados, atuam de forma efetiva no processo de carcinogênese. Dentre eles encontram-se genes supressores de tumor e protooncogenes que podem atuar nas diversas fases da carcinogênese como a iniciação, promoção e progressão (Tsao et al., 2007). Geralmente as primeiras alterações genéticas presentes na carcinogênese são mutações e deleções, sendo também encontradas alterações epigenéticas como metilações (Brown e Kane, 2006; Duarte et al., 2008).

O HPV é um dos fatores que pode estar associado à etiologia das leucoplasias, principalmente os subtipos HPV 16, 18 e eventualmente 6 e 11 (Greer, 2006). As proteínas virais liberadas pelo HPV causam alterações moleculares nas células epiteliais do hospedeiro, resultando na desregulação do ciclo celular (Brown e Kane, 2006).

Outro fator associado à leucoplasia é a candidíase. É proposto na literatura que a colonização pela *Candida albicans*, principalmente nas leucoplasias verrucosas, também participa do processo de carcinogênese. Esse fungo produz nitrosaminas que atuam na transformação do epitélio normal em epitélio displásico (Greer, 2006).

A pasta de betel é pouco utilizada nos países ocidentais, porém muito consumida nos países orientais. Embora muitas vezes o tabaco seja um dos componentes da pasta de betel, em algumas regiões, como Taiwan, o tabaco não participa da composição do produto. De acordo com um trabalho realizado em Taiwan, independentemente da fórmula que a pasta de betel apresente, ela está relacionada à etiologia da leucoplasia (Yang et al., 2005).

O acetaldeído é o primeiro metabólito derivado do álcool e é altamente reativo, podendo ligar-se a proteínas, estruturas celulares ou ao DNA,

formando estruturas estáveis. A associação entre acetaldeído, derivados do cigarro e o DNA pode ser uma das chaves do processo de carcinogênese (Warnakulasuriya et al., 2008).

Dentre todas as possíveis causas para o surgimento das leucoplasias, a de maior importância clínica é o tabaco (Bouquot e Whitaker, 1994; Saito et al., 1999; Reibel, 2003; Hashib et al., 2003; Lee et al., 2006; Greer, 2006; Brown e Kane, 2006; Tsao et al., 2007; Hsue et al., 2007).

O hábito do tabagismo foi introduzido na Europa pelos portugueses e espanhóis no século XVI (Caldeira et al., 2007). Atualmente o tabaco é uma das drogas mais consumidas do mundo. O cigarro apresenta mais de 4000 substâncias em sua composição, sendo a nicotina a principal responsável pelo vício, além de outros efeitos deletérios (Caldeira et al., 2007; IARC, 2002). Além da nicotina, o cigarro apresenta outros carcinógenos como o alcatrão, o monóxido de carbono, o benzeno e compostos orgânicos voláteis que causam mutações genéticas e anormalidades nos cromossomos (IARC, 2002).

Em um trabalho do tipo caso controle os autores avaliaram o efeito da nicotina injetada em *Rattus norvegicus*. Os autores observaram que o epitélio da mucosa jugal dos ratos do grupo caso apresentava-se atrófico e exibindo um aumento do espaço intercelular e células com alteração da proporção entre o núcleo e o citoplasma. Essas alterações não foram observadas no grupo caso (Caldeira et al., 2007).

Além das alterações morfológicas, várias são as ações do cigarro no interior das células, entre elas a ativação da proliferação celular e carcinogênese. Um estudo realizado por Du et al. (2005) mostraram que os derivados do cigarro são capazes de ativar a cAMP (adenosina monofosfato cíclico), um modulador de vários dos processos fisiológicos. Uma vez ativada, ela se liga à proteína quinase A (PKA), responsável por algumas funções, dentre elas a transcrição da anfirregulina, um dos ligantes do EGFR. Uma vez transcrita, a anfirregulina estimula a proliferação celular através da ativação do EGFR. A ativação desse receptor de membrana leva a ativação de outras substâncias como a uPA (ativador plasmogênico tipo uroquinase). A uPA é

uma proteína associada à degradação de matriz extracelular, sendo esta degradação uma das formas de se possibilitar a migração celular (Du et al., 2007). Além da uPa, o EGFR, quando ativado pelo tabaco, também estimula a produção de prostaglandinas pela COX-2 (ciclooxigenase 2), dentre elas a PGE2 (prostaglandina E2), que atua no *feedback* positivo, mantendo a ativação do EGFR (Brown e Kane, 2006).

A literatura mostra que, dependendo do estágio de acometimento celular causado pelo cigarro, quando o hábito de fumar é interrompido, há uma involução da leucoplasia (Reibel, 2003; Greer, 2006). Ainda assim, Scully e Potter (2007) nos mostram que 75% dos casos de CCEB ocorrem em pacientes fumantes.

2.2) EGFR e leucoplasia

Os mecanismos associados ao surgimento da leucoplasia relacionam-se também com a expressão de fatores de crescimento (Brown e Kane, 2006).

A família Her ou ErbB é formada por receptores de fatores de crescimento localizados na superfície celular. Os integrantes dessa família são EGFR / Her-1 ou cerbB-1; Her-2 / *c-neu* / ErbB-2; HER-3 / ErbB-3 e Her-4 / ErbB-4 (Diniz-Freitas et al., 2007; Zhu et al., 2007).

O EGFR é um importante receptor de membrana, com atividade tirosina quinase, pertencente à família ErbB (Ling et al., 2007; Galizia et al., 2006; Zhu et al., 2007; Diniz-Freitas et al., 2007) e localiza-se no cromossomo 7p12-13 (Werkmeister e Brandt, 1999). A ativação do EGFR pode ser feita por diversos ligantes e é importante para a proliferação e diferenciação normal das células (Rautava et al., 2008). Quando ativado de forma exacerbada, o EGFR inicia uma complexa cascata intracelular promovendo divisão e migração celular, angiogênese e inibição da apoptose. A superexpressão desse receptor parece estar relacionado à maior agressividade das lesões, levando a um pior prognóstico (Galizia et al., 2006).

A amplificação do EGFR e a expressão aumentada da proteína já foram descritas em leucoplasias bucais permitindo especulações sobre a participação

do EGFR no processo de transformação maligna (Shin et al., 1994; Werkmeister e Brandt., 1999; Nagatsuga et al., 2001).

A avaliação da amplificação do gene EGFR em leucoplasias, carcinoma *in situ* e CCEB pela técnica da PCR foi realizada por Nagatsuka et al. (2001). Os autores não encontraram a amplificação do gene em epitélio normal. Já nas leucoplasias, o EGFR mostrou-se amplificado em três dos dezoito casos avaliados. Dos dois casos de atipia leve, nenhum mostrou amplificação, dos 8 casos de atipia moderada 1 apresentou-se amplificado e dos 8 casos de atipia severa, 2 apresentaram-se amplificados.

Rautava et al. (2008) avaliaram a expressão do EGFR em epitélio da mucosa fetal (em formação), epitélio de mucosa normal de adultos e epitélio leucoplásico de adultos. O epitélio fetal apresentou imunomarcagem em todas as células epiteliais. O epitélio normal do adulto mostrou-se bem marcado para o EGFR apenas na camada basal e o epitélio displásico, com marcação até a metade do epitélio.

Shin et al. (1994) avaliaram a imunexpressão do EGFR em epitélios normais de pacientes não fumantes e livres de leucoplasias e CCEB (controle), em epitélios normais adjacentes ao CCEB, em hiperkeratoses e leucoplasias com displasia epitelial. Os autores observaram que no grupo controle a imunomarcagem para o EGFR apresentou-se com intensidade fraca e limitada à camada basal. O epitélio normal adjacente ao tumor, embora não apresentasse alterações histológicas, apresentou uma imunomarcagem mais intensa e que se estendeu para a camada parabasal. Os autores encontraram ainda que, na hiperkeratose e nos epitélios displásicos, a imunexpressão do EGFR foi aumentando progressivamente desde a hiperkeratose até o CCEB.

Werkmeister e Brandt (1999) avaliaram o EGFR pela técnica da PCR em 13 casos de leucoplasia. Os estudos revelaram que 4 casos apresentaram deleção do EGFR e 4 casos amplificação do EGFR, enquanto que os outros casos apresentaram-se normais.

Além das leucoplasias, o EGFR está superexpressado em várias neoplasias, dentre elas o CCEB (Brown e Kane, 2006). A superexpressão do EGFR em neoplasias parece estar relacionada a baixa sobrevida, estágio avançado da doença, pouca diferenciação celular, alto índice proliferativo e aumento do risco de metástase (Lee et al., 2007 B; Galizia et al., 2006; Ling et al., 2007).

Em função dessa superexpressão do EGFR em lesões cancerizáveis e neoplásicas, algumas das drogas propostas para o tratamento do CCEB buscam, pelas mais diferentes formas, a inativação do EGFR. O Gefitinib é uma das drogas usadas no tratamento de cânceres. Trabalhos experimentais mostram que esse medicamento, ao bloquear a atividade tirosina quinase do EGFR, leva ao aumento do p27, um inibidor da quinase dependente de ciclina, mantendo a célula na fase G1 do ciclo celular (Shintani et al., 2004). O ZD1839 também é um medicamento usado no tratamento do câncer que, ao inibir a ação do EGFR, leva a uma parada do ciclo celular em G0/G1, elevando os níveis de p21 e p27, ambos inibidores do ciclo celular (Lee et al., 2007 B).

2.3) Proliferação celular

O epitélio é formado por vários estratos celulares, sendo a camada basal a principal responsável pela proliferação celular. As células proliferativas localizadas nessa região do epitélio são as principais responsáveis pela renovação tecidual, processo normal da cavidade bucal (Braakhuis et al., 2004). O ciclo celular é composto por várias fases, sendo a G0 formada pelas células quiescentes ou estáveis, G1, S e G2 que são fases de preparo para a divisão celular e síntese de DNA e M, que é a fase da mitose (Zhu et al., 2007). As fases G1, S e G2 compreendem a intérfase, período entre as divisões celulares (Filho et al., 2006).

A progressão do ciclo celular depende intrinsecamente da formação de complexos protéicos, regulação dos pontos de checagem e uma série de fosforilações e desfosforilações das proteínas (Yeudall e Jakus, 1995). Dessa forma, o ciclo celular consiste em uma série de eventos que levam à duplicação do DNA e divisão celular. No entanto, no decorrer desse ciclo, as células são

submetidas a checagens, sendo os principais pontos entre G1/S e G2/M. Caso não haja danos no DNA, a célula ultrapassa esse ponto permanecendo no ciclo. Defeitos no DNA que não sejam identificados nesses pontos podem levar à propagação de células defeituosas, resultando na proliferação de células cancerosas (Filho et al., 2006).

A regulação desse ciclo é feita, principalmente, pela integração de duas classes de proteínas, as CDKs (quinases dependentes de ciclinas) e as ciclinas. As ciclinas se ligam às CDKs e controlam as taxas de fosforilação das proteínas responsáveis pelo ciclo celular. A transição da fase G1 para a fase S é regulada pela ativação de ciclinas como a ciclina D, ciclina E e ciclina A. Uma vez fosforilado, o complexo ciclina / CDK pode se ligar à CDKI (inibidor de quinase dependente de ciclina), sendo refosforilado e saindo do ciclo celular ou a CDKI pode ser inativada por proteínas da família cdc25, que leva a uma desfosfolilação do complexo ciclina / CDK, entrando na fase de mitose, culminando na replicação celular (Filho et al., 2006).

O Ki-67 é uma proteína relacionada à proliferação celular sendo primeiramente descrita por Gerdes et al. em 1983 (Özdemir et al., 2001) já tendo sido estudada a sua localização nuclear em linhagens celulares de carcinoma de pulmão na fase de mitose (Verheijen et al., 1989). O gene dessa proteína localiza-se no braço longo do cromossomo 10 (10q25) e começa a ser expresso nas células proliferativas na fase S do ciclo celular, atingindo o ápice na mitose (Liu e Klein-Szanto, 2000; Zhu et al., 2007) e decrescendo progressivamente após a divisão celular. Os anticorpos anti-Ki-67 são muito usados como marcadores de proliferação celular (Takeda et al., 2006; Zhu et al., 2006; Teresa et al., 2007; Thomson et al., 2008; Montebugnoli et al., 2008), em especial o clone Mib-1 que pode ser empregado em material parafinizado (Liu e Klein-Szanto, 2000).

As CDKIs são reguladoras negativas do ciclo celular, que atuam de forma a impedir que essas fosforilações sejam realizadas pelas CDKs. Os mamíferos apresentam duas grandes famílias de CDKI, a INK4, formada pela

p15, p16, p18 e p19 e a KIP/CIP, formada pela p21, p27 e p57 (Jordan et al., 1998; Schoelch et al., 1999; Ling et al., 2007).

A p27 é uma das proteínas de ação CDKI pertencente à família KIP/CIP (Jordan et al., 1998; Ling et al., 2007; Zhu et al., 2007), localizada no cromossomo humano 12q12.3 (Yeudall e Jakus, 1995) que participa da inibição do ciclo celular evitando que a célula entre na fase G1 (Tsuzuki et al., 2003; Lee et al., 2007 B). Tsuzuki et al. (2003) encontraram em seu estudo que as leucoplasias apresentavam maior expressão imunoistoquímica de p27 que os CCEB. Além disso, os casos de leucoplasia com maior expressão de p27 apresentaram também as maiores porcentagens de apoptose.

O trabalho experimental realizado por Lee et al. (2007 B) sugere que a translação do RNAm do p27 mantiveram-se no ciclo celular até a fase S. A Cdk2 e Skp2 são responsáveis pela proteólise da p27, impedindo o acúmulo intracelular dessa proteína. No entanto, algumas vezes a proteólise não é totalmente efetiva, permitindo o acúmulo da proteína p27 na célula e conseqüentemente mantendo-a em G1. A Cdk2 é uma proteína responsável pela fosforilação da p27 na região Thr-187, possibilitando a ubiquitinação da p27 pela proteína ubiquitina-ligase Skp2, permitindo então, a degradação da p27. Esse evento ocorre entre as fases G1 e S do ciclo celular. No entanto, a p27 também pode ser degradada por outras vias, em outras regiões da proteína, como por exemplo a fosforilação da região Ser10, ocorrendo entre as fases G0 e G1 do ciclo celular (Lee e Kay, 2007). De acordo com Besson et al. (2009), a Cdk2 se torna ativa no final da fase G1 e atua na fosforilação do p27. Essa fosforilação cria um ponto de ligação entre a Skp2 e a p27 levando à degradação da p27.

Ben-Izhak et al. (2005) também avaliaram em seu trabalho a interação entre a p27 e a Skp2. A inativação da p27 é de grande importância para que se complete o ciclo celular, sendo que uma das formas de inativação dessa proteína se dá pela ação da Skp2, uma subunidade da ubiquitina-ligase E3, que atua em uma das principais vias de degradação da p27. Dessa forma, o

aumento da degradação da p27 pode levar a uma proliferação celular descontrolada e a um aumento da chance de transformação maligna.

O estudo realizado por Thomson et al. (2008) em leucoplasias encontrou que o aumento da expressão do Ki-67 acompanhou o agravamento da atipia epitelial. O estudo de Saito et al. (1999) avaliou o p27 e Ki-67 em lesões cancerizáveis e em carcinoma verrucoso. Nesse estudo observou-se que tanto o Ki-67 quanto o p27 apresentaram marcação nuclear. No epitélio displásico, a marcação para o p27 limitou-se praticamente às camadas suprabasais, ocorrendo diminuição da marcação de acordo com o aumento da displasia, diferentemente do Ki-67 que apresentou uma marcação principalmente nas camadas basal e parabasal. Gonzales-Moles et al. (2000) em seu estudo também encontraram que a imunoexpressão do Ki-67 na camada suprabasal aumentou com o aumento da atipia epitelial. Teresa et al. (2007) observaram que a expressão do Ki-67 aumentou na seguinte ordem, hiperkeratoses, epitélio displásico e CCEB.

Tanto o EGFR quanto o Ki-67 são proteínas relacionadas à proliferação celular. Em função disto, alguns trabalhos em CCEB e em leucoplasias estudaram a associação entre essas duas proteínas (Diniz-Freitas et al., 2007 e Rautava et al., 2008).

O EGFR também tem sido estudado juntamente com o p27. Galizia et al. (2006) observaram em estudos com câncer de cólon que as amostras da neoplasia que se apresentavam positivas para o EGFR e com baixa concentração de p27 apresentavam grande chance de recorrência em 48 meses após a cirurgia de remoção da lesão.

Ben-Izhak et al. (2005) em seu estudo avaliaram a imunoexpressão da p27 em CCEB de língua com um outro membro da família c-erb, o Her-2. Os autores encontraram associação entre essas duas proteínas, bem como uma associação da p27 com a porcentagem de apoptose nas lesões.

Estudos experimentais também avaliaram a relação entre o EGFR e o p27. Lee et al. (2007 B) em estudos *in vitro* de um quimioterápico (Iressa)

observaram que à medida que o quimioterápico inibia a expressão de EGFR, aumentava a expressão de p27.

3) Objetivos

3.1) Objetivo Geral

Avaliar a expressão do *EGFR* pela imunohistoquímica em leucoplasias bucais.

3.2) Objetivos Específicos

- 1) Avaliar a associação da imunoexpressão do *EGFR* com a presença de atipia epitelial em leucoplasias bucais.
- 2) Avaliar a associação da imunoexpressão do *EGFR* com o tabagismo em pacientes com leucoplasias bucais.
- 3) Avaliar a associação da imunoexpressão do *EGFR* com a localização da leucoplasia conforme o risco de malignização.
- 4) Verificar a associação entre *EGFR* com o grau de expressão do Ki-67 em leucoplasias bucais.
- 5) Verificar a associação entre *EGFR* com o grau de expressão do p27 em leucoplasias bucais.
- 6) Verificar a associação entre Ki-67 e a atipia epitelial em leucoplasias bucais.
- 7) Verificar a associação entre p27 a atipia epitelial em leucoplasias bucais.

4) Justificativa

A leucoplasia é a principal lesão precursora do CCEB sendo, portanto, de grande importância o conhecimento dos mecanismos associados à transformação da leucoplasia em uma lesão neoplásica.

O *EGFR* está associado ao desenvolvimento de várias neoplasias epiteliais, incluindo o CCEB. Uma das possíveis formas de sua ação ocorre através do estímulo à proliferação celular, seja levando a um aumento na expressão de proteínas estimuladoras de proliferação, seja pela inibição dos controladores negativos do ciclo celular ou pela associação de ambas. O fumo, além de ser um dos principais fatores etiológicos das leucoplasias, também pode estimular um aumento na expressão do EGFR ao levar a uma maior produção de seus ligantes (anfirregulina). Além disso, as alterações de atipia epitelial são um dos principais preditores de progressão para a malignidade. A localização da leucoplasia na cavidade bucal também está associada a este tipo de transformação. Assim, é importante a avaliação de cada um desses fatores e de suas possíveis associações às leucoplasias bucais.

5) Metodologia

5.1) Obtenção da amostra e seleção dos casos

A amostra selecionada compreendeu 48 casos de leucoplasia bucal pertencentes ao arquivo do laboratório de Patologia Bucal e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG. Essas 48 amostras foram selecionadas dentre 532 casos de leucoplasia existentes no arquivo, do período de julho de 2002 a novembro de 2008. Todos os casos tiveram o diagnóstico histológico de hiperqueratose sem atipia ou com atipia epitelial em diferentes graus. Todas as amostras foram provenientes de biópsia incisiva, previamente fixadas em formol tamponado 10% e incluídas em parafina. A amostra foi coletada de julho de 2002 a dezembro de 2008.

Cortes histológicos de leucoplasia corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) foram avaliados para confirmação do diagnóstico e verificação da quantidade de material, se suficiente para o estudo imunoistoquímico. A avaliação foi realizada por dois observadores independentes sem conhecimento prévio do diagnóstico histológico, utilizando-se um microscópio óptico de luz, marca Zeiss. Não foram incluídos casos com processo inflamatório intenso, casos cuja localização fosse em lábio ou que não apresentavam dados completos necessários à pesquisa (gênero, localização da lesão e hábito de tabagismo). Não foi adotado critério de exclusão como sexo, cor, idade, nacionalidade, procedência ou profissão.

Todos os casos foram classificados quanto ao hábito de tabagismo (fumante ou não fumante), gênero e localização sendo esta dividida em duas categorias: alto risco (língua e soalho) e baixo risco (demais localizações) (Liu e Klein-Szanto, 2000). A graduação histológica foi realizada de acordo com o critério de De Paula e Gomez (2001).

As amostras foram classificadas, quanto ao grau de displasia, baseando-se nas alterações descritas no quadro 1. De acordo com o grau de acometimento e com a presença ou ausência de projeções epiteliais, as lesões foram classificadas como apresentando ausência de atipia (hiperqueratose), atipia epitelial discreta, atipia epitelial moderada ou atipia epitelial severa (Quadro 2).

Quadro 1 – Características histológicas de atipia epitelial (De Paula e Gomez, 2001)

Pleomorfismo nuclear e celular;	Hipercromatismo nuclear;
Nucléolos proeminentes e irregulares;	Alteração na relação núcleo-citoplasma;
Aumento do número de figuras de mitose;	Figuras de mitose atípicas;
Alteração na polarização da camada basal;	Duplicação da camada basal;
Ceratose intraepitelial;	Perda da estratificação;
Projeções epiteliais em forma de gota.	

Quadro 2 – Graduação histológica das leucoplasias (De Paula e Gomez, 2001)

Graduação Histológica	Critério de Classificação
Hiperkeratose (ausência de displasia)	Ausência de alterações morfológicas ou presença de apenas uma alteração
Atipia Discreta	Presença de duas ou mais alterações morfológicas restritas às camadas inferiores do epitélio
Atipia Moderada	Presença de duas ou mais alterações morfológicas acometendo metade da espessura do epitélio ou presença de projeções epiteliais em forma de gota
Atipia Severa	Presença de duas ou mais alterações morfológicas acometendo mais da metade do epitélio

5.2) Técnica imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram realizadas através da técnica streptoavidina / biotina. As reações para as três proteínas (EGFR, Ki-67 e p27) foram realizadas no Laboratório de Imunoistoquímica da Faculdade de Odontologia da UFMG, utilizando-se a técnica manual.

As reações foram feitas em cortes histológicos de 4 micrômetros de espessura, estendidos sobre lâminas de vidro previamente gelatinizadas.

Os cortes histológicos foram desparafinizados inicialmente em estufa (FABBE-PRIMAR), depois imersos em dois banhos de xilol sendo o primeiro de 30 minutos dentro de estufa e o segundo de 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida foram reidratados em cadeia decrescente de etanol (100%, 90% e 70%) e imersos por 10 minutos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a 95% para remoção de pigmentos formólicos e lavados em cinco banhos de água destilada.

O protocolo da recuperação antigênica está descrito na tabela 1.

O bloqueio da atividade de ligação à avidina endógena foi realizado de acordo com o proposto por Miller et al. (1999). Para a inibição da peroxidase endógena os cortes foram submetidos a dois banhos de 15 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 10% para o EGFR e Ki-67 e dois banhos de 10 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 10% em metanol para o p27, sendo todos seguidos de lavagem em 5 banhos de água destilada.

Todas as incubações descritas a seguir foram precedidas de três banhos de solução tampão TRIS-HCl pH = 7,4 (Hidroxi-metil-aminometano- ácido clorídrico) de cinco minutos cada.

Os cortes foram incubados no anticorpo primário anti-EGFR (Zymed, San Francisco, CA, USA) diluídos em BSA e nos anticorpos anti-Ki-67 (Dako, Carpinteria, USA) e anti-p27 (Dako, Carpinteria, USA) diluídos em Tris-HCl. As diluições, tempo e temperatura de incubação estão descritos na tabela 1. Para a incubação do anticorpo secundário e complexo terciário foi utilizado o do kit

LSAB+ (Dako, Carpinteria, USA) sendo cada uma das incubações feita por 30 minutos à temperatura ambiente.

A revelação da reação foi feita com tetrahydrocloridrato de diaminobenzidina (DMBA) (Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) sólida diluída em tampão TRIS-HCl pH = 7,4 em peróxido de hidrogênio 10% por 3 minutos. Seguiu-se com lavagem dos cortes em um banho de TRIS-HCl pH = 7,4 seguidos de cinco banhos em água destilada.

A contra coloração foi feita com solução de hematoxilina de Mayers por 40 segundos, seguida por uma lavagem em solução aquosa de hidróxido de amônio e cinco banhos de água destilada.

Posteriormente os cortes foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol, diafinizados em xilol e montados com lamínulas de vidro em Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA).

TABELA 1

Anticorpos primários empregados e seus respectivos tratamentos para a recuperação antigênica, diluição, tempo e temperatura de incubação

	Clone	Tratamento para a recuperação antigênica	Diluição	Tempo e temperatura de incubação
EGFR	31G7	Estufa (30 minutos a 37° em solução de pepsina)	1 :100	18 horas em temperatura ambiente
Ki-67	Mib-1	Pressão (20 minutos pressão 1 em solução de ácido cítrico)	1 : 100	18 horas em temperatura ambiente
p27	SX536 8	Pressão (20 minutos pressão 1 em solução de TRIS/EDTA)	1 : 150	18 horas a 4° C

Controles negativos consistiram na omissão do anticorpo primário. Como controle positivo, foram utilizados cortes de hiperplasia fibrosa sabidamente positivos para as proteínas Ki-67 e EGFR e de tonsila palatina para o p27.

5.3) Análise da imunomarcacão

Os casos foram posteriormente avaliados em microscópio óptico de luz em aumento de 400x (Axiostar, Zeiss).

A análise da expressão do EGFR foi feita na membrana celular sendo considerada positiva a coloração acastanhada da mesma. A classificação foi feita por índices que variaram de 0 a 4 (Diniz-Freitas et al., 2007):

0 – sem marcação ou marcação inferior a 10% da extensão total do epitélio

1 – marcação fraca, homogênea ou não, superior a 10% da extensão total do epitélio

2 – marcação moderada, homogênea ou não, superior a 10% da extensão total do epitélio

3 – marcação intensa, homogênea ou não, superior a 10% da extensão total do epitélio

A partir desses índices foi estabelecido um grau de marcação, sendo considerados negativos os índices 0 e 1 e positivos os índices 2 e 3.

Para o Ki-67 e p27 foram consideradas como positivas as células que apresentaram núcleos de coloração castanha, como resultado da precipitação da DMBA. As células com núcleos de coloração azul, coradas pela Hematoxilina de Mayers foram consideradas negativas. O objetivo final dessa análise foi a geração de um índice de contagem para cada estrato epitelial. Estes índices foram estabelecidos a partir da contagem do número de células positivas em 500 células para cada camada do epitélio. As camadas epiteliais consideradas foram as seguintes (Liu e Klein-Szanto, 2000; Takeda et al., 2006):

Basal – todas as células em contato com a membrana basal

Parabasal – duas camadas imediatamente superiores à camada basal

Suprabasal – demais camadas do epitélio

Um índice total foi obtido a partir somatória das células positivas e negativas obtidas na contagem de cada um dos estratos epiteliais, totalizando 1500 células. A partir do índice total foi obtido um grau de marcação com ponto de corte em 20%, sendo considerados positivos os casos com índice $\geq 20\%$ (Srinivasan e Jewell, 2001; Montebugnoli et al., 2008). Esse resultado dicotomizado foi utilizado na análise da imunomarcação do Ki-67 e p27 com o EGFR. Para as demais análises envolvendo o Ki-67 e p27 foi utilizado o índice percentual de células positivas em cada estrato epitelial.

Para todas as análises foram usadas siglas para identificar a proteína e o estrato epitelial estudado. A primeira parte da sigla se refere à proteína avaliada, a segunda ao estrato epitelial e a terceira em relação ao percentual de marcação. Exemplo: KiBPerc – Índice percentual de positividade na camada basal para o Ki-67; p27TPerc – Índice percentual de positividade total do epitélio para o p27.

5.4) Análise Estatística

A existência de associação entre o grau de marcação para o EGFR com a localização e o tabagismo foi avaliada pelo teste qui-quadrado de Pearson (χ^2). A associação entre o EGFR e o grau de atipia foi avaliada pelo teste exato de Fisher.

A associação entre a positividade para o Ki-67 e p27 ($\geq 20\%$) e o grau de marcação para o EGFR foram pesquisados através do teste χ^2 ou do teste exato de Fisher.

Para avaliar a existência de diferença na atividade proliferativa entre as diversas camadas epiteliais em lesões de diferentes graus foram utilizados os índices percentuais de Ki-67 e p27.

Após o teste Shapiro-Wilk para se verificar a distribuição dos dados, foram realizadas ANOVA e o teste de Kruskal-Wallis. Para análise da associação dos índices de p27 com o grau de atipia utilizou-se o teste Post Hoc de Tukey e Mann-Whitney, com correção de Bonferroni.

O programa estatístico utilizado foi o SPSS v.15 (SPSS Inc; Chicago, IL, USA). O nível de significância utilizado foi $p < 0,05$ e $0,016$ apenas para a correção de Bonferroni.

5.5) Aspectos éticos e legais

O projeto foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-MG), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos, tendo sido aprovado, ETIC 48/08 (Anexo 3).

6) RESULTADOS

6.1) Caracterização da amostra

Dos 48 casos de leucoplasia bucal selecionados, 20 eram pacientes do gênero feminino e 28 do gênero masculino, sendo a média de idade 53 anos. O paciente mais jovem apresentava 24 anos e o mais velho 78 anos. Em relação ao tabagismo, 30 casos eram fumantes e 18 não fumantes. Em relação à localização, 34 apresentavam-se em áreas de baixo risco e 14 de alto risco. Quanto à graduação histológica, 5 casos foram classificados como hiperqueratose, 23 como atipia epitelial discreta, 20 como atipia epitelial moderada e nenhum caso como atipia epitelial severa (Anexo 1) (Figura 1A).

6.2) Análise descritiva da imunomarcacão

A imunomarcacão para o EGFR mostrou-se negativa em 18 casos e positiva em 30 casos. A imunomarcacão foi avaliada pela coloracão acastanhada ou marrom na membrana celular, embora alguns casos também tenham apresentado uma coloracão citoplasmática. A intensidade de marcaçãõ também apresentou variaçãõ entre as amostras. Os casos que exibiram imunomarcacão de coloracão castanho claro foram considerados negativos, enquanto que as intensidades mais escuras, tendendo à coloracão marrom foram consideradas positivas. Todos os 30 casos positivos para o EGFR mostraram positividade nas camadas basal e suprabasais, sendo 26 casos com imunomarcacão se estendendo até a camada espinhosa, ainda que focalmente e 4 se apresentaram com imunomarcacão alcançando até a camada granulosa (Figura 1B).

Os graus de marcaçãõ para o EGFR, p27 e Ki-67 e os dados relativos a atipia, tabagismo e localizaçãõ para cada um dos 48 casos estãõ descritos na tabela 2. Os dados descritivos de cada caso estãõ no anexo 2.

Nãõ foi encontrada associaçãõ estatisticamente significativa entre a expressãõ de EGFR e o tabagismo e grau de atipia epitelial. Foi encontrada associaçãõ estatisticamente significativa entre o EGFR e a localizaçãõ das leucoplasias. Lesões em áreas de alto risco apresentaram maior tendênciã à

expressão do EGFR, sendo que 85% das 14 lesões em áreas de alto risco apresentaram-se positivas para esse anticorpo.

O EGFR não apresentou associação estatisticamente significativa com o Ki-67 quando considerado o epitélio como um todo, nem quando avaliado para cada camada epitelial.

A positividade para o Ki-67 foi avaliada pela imunomarcção de coloração acastanhada ou marrom e restrita ao núcleo em todos os estratos epiteliais. A imunomarcção para o p27 também se apresentou com coloração acastanhada e restrita ao núcleo nas camadas parabasal e suprabasal. Dois casos não apresentaram células positivas na camada basal e nenhum caso apresentou-se com mais de 20% de células imunopositivas na camada basal para o p27 (Figuras 1C e 1D).

A associação do EGFR com o p27 mostrou-se estatisticamente significativa quando avaliado o epitélio como um todo, embora não tenha sido observada associação entre o EGFR e o grau de marcação para as camadas parabasal e suprabasal. Nenhum caso apresentou-se com marcação acima de 20% para o p27 na camada basal, portanto, não foi feita análise estatística entre o grau de marcação o p27 na camada basal e o EGFR.

FIGURA 1

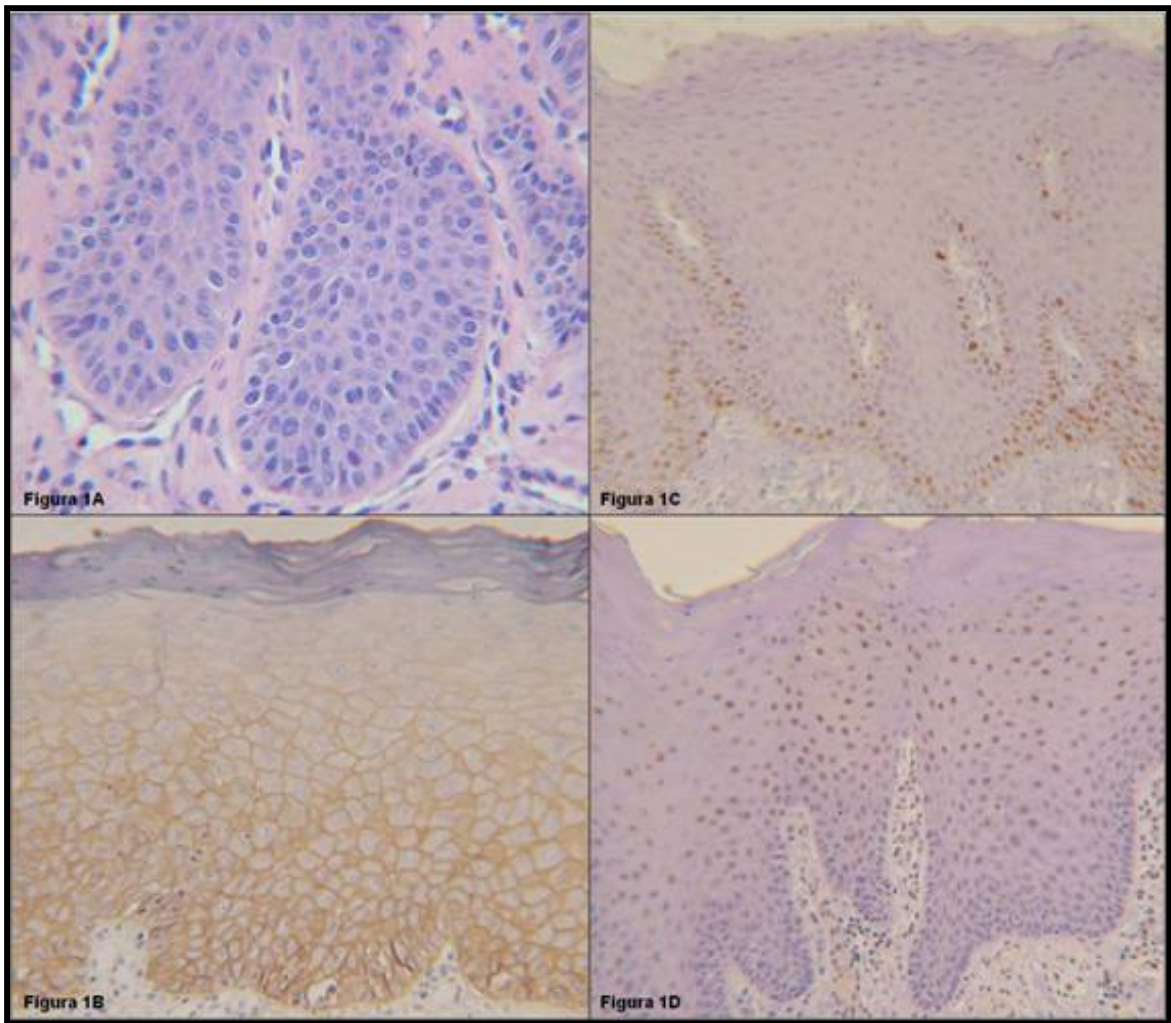


Figura 1A – Cortes histológicos de atipia moderada, mostrando projeções epiteliais em forma de gota (HE, 414X).

Figura 1B – Expressão imunoistoquímica do EGFR, pela Streptoavidina-biotina (215X)

Figura 1C – Expressão imunoistoquímica do Ki-67, pela Streptoavidina-biotina (215X), apresentando imunomarcção restritas à camada basal e parabasal.

Figura 1D – Expressão imunoistoquímica do p27, pela Streptoavidina-biotina (214X), apresentando imunomarcção positiva para as camadas mais superiores do epitélio.

TABELA 2

Associação da imunoexpressão do EGFR com características clínicas, graduação histológica e proliferação celular

	EGFR		Valor p
	Negativo	Positivo	
Tabagismo			
Não Fumante	4	14	0,090*
Fumante	14	16	
Localização			
Baixo risco	16	18	0,033*
Alto risco	2	12	
Graduação histológica			
Hiperkeratose	2	3	1,000°
Atipia Discreta	9	14	
Atipia Moderada	7	13	
Grau de marcação para Ki-67			
Total de células com marcação ≥20%	12	19	0,815*
Total de células com marcação <20%	6	11	
Grau de marcação para Ki-67			
Basal com marcação ≥20%	13	20	0,688*
Basal com marcação <20%	5	13	
Grau de marcação para Ki-67			
Parabasal com marcação ≥20%	17	30	0,375°
Parabasal com marcação <20%	1	0	
Grau de marcação para Ki-67			
Suprabasal com marcação ≥20%	1	1	1,000°
Suprabasal com marcação <20%	17	29	
Grau de marcação para p27			
Total de células com marcação ≥20%	13	12	0,031*
Total de células com marcação <20%	5	18	
Grau de marcação para p27			
Basal com marcação <20%	18	30	a
Grau de marcação para p27			
Parabasal com marcação ≥20%	2	2	0,624°
Parabasal com marcação <20%	16	28	
Grau de marcação para p27			
Suprabasal com marcação ≥20%	17	27	1,000°
Suprabasal com marcação <20%	1	3	

*Teste qui-quadrado Pearson

°Teste exato de Fisher

a - não houve teste estatístico

Os índices percentuais do Ki-67 nas camadas basal, parabasal, suprabasal e total não mostraram associação com o grau de atipia epitelial. Os índices para p27 na camada basal também não mostraram associação. No entanto, diferenças nos índices de p27 parabasal, suprabasal e total foram encontradas entre os diferentes graus de atipia. No entanto, quando aplicados os testes Post Hoc de Tukey e Mann-Whitney com correção de Bonferroni, apenas o p27TPerc apresentou valor de p significativo. Para as demais variáveis não foram identificadas diferenças entre os grupos de atipia. Dessa forma, considera-se que apenas o p27TPerc apresentou valor de p estatisticamente significativo (Tabelas 3 e 4).

TABELA 3

Valores médios para o Ki-67 total e em cada estrato epitelial em relação aos diferentes graus de atipia epitelial

	KiBPerc^o	KiPbPerc*	KiSbPerc^o	KiTerc^o
	Mediana	Média	Mediana	Mediana
Hiperceratose	15,40	38,84	6,71	19,83
Atipia discreta	22,05	43,13	7,08	23,66
Atipia moderada	34,14	37,65	6,70	25,45
Valor p	0,116	0,286	0,670	0,713

*ANOVA

^oTeste Kruskal-Wallis**TABELA 4**

Valores médios para o p27 total e em cada estrato epitelial em relação aos diferentes graus de atipia epitelial

	p27BPerc^o	p27PbPerc^o	p27SbPerc*	p27TPerc*
	Mediana	Mediana	Média	Média
Hiperceratose	3,77	10,61	55,63	23,58 ^{a b}
Atipia discreta	2,46	7,85	49,96	22,19 ^a
Atipia moderada	2,04	4,56	39,01	15,80 ^b
Valor p	0,220	0,035	0,048	0,014 ^{a b}

*ANOVA

^oTeste Kruskal-Wallis

Símbolos indicativos diferentes para cada valor da média para a coluna do p27TPerc indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Símbolos indicativos iguais para cada valor da média para a coluna do p27TPerc indicam ausência de diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

7) Discussão

A leucoplasia é a principal lesão potencialmente maligna da boca sendo importante a pesquisa dos fatores associados ao risco de malignização. Os receptores c-erbB, em especial o EGFR, têm recebido atenção especial na avaliação de neoplasias epiteliais devido aos possíveis benefícios das terapias moleculares de bloqueio do EGFR (Rautava et al., 2008).

No presente trabalho avaliou-se pela técnica de imunistoquímica a expressão do EGFR em leucoplasias bucais associando-se esta expressão ao tabagismo, localização das lesões, atipia epitelial e proliferação celular, sendo o último representado pelo Ki-67 e p27.

Para se avaliar a associação entre a expressão do EGFR e os dados relacionados à leucoplasia, foi necessário, inicialmente, fazer a caracterização da nossa amostra. A mesma foi composta por 48 casos de leucoplasia bucal, todos pertencentes ao arquivo do Laboratório de Patologia Bucal e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG. Quanto ao gênero e idade, foram incluídos 20 mulheres e 28 homens, com média de idade de 53 anos. Bouquot e Whitaker (1994) e Greer (2006) descreveram em seus trabalhos que a idade de maior prevalência da leucoplasia é acima dos 40 anos, acometendo mais o gênero masculino que o feminino. No estudo realizado por Werkmeister e Brandt (1999), a amostra utilizada constava de 2,3 homens para cada mulher, sendo a amostra composta de 13 pacientes, com média de idade de 54 anos. Este trabalho encontra-se dentro do proposto na literatura quanto ao gênero e a média de idade dos pacientes. No entanto acredita-se que as amostras possam variar em alguns estudos dependendo do objetivo da pesquisa e do local ou centro de coleta da amostra. Por exemplo, casos coletados em hospitais de referência na saúde da mulher, provavelmente apresentarão um número muito maior de casos acometendo o gênero feminino do que o masculino. Kleinman et al. (1991) em seu trabalho ressaltaram a importância da metodologia e seleção da amostra, explicitando trabalhos epidemiológicos em leucoplasias realizados com amostras tendenciosas.

A pesquisa de biomarcadores que indicam com maior precisão o risco de transformação maligna das leucoplasias tem sido objetivo de trabalhos

variados (Birchall et al., 1997; Duarte et al., 2008; De Paula e Gomez, 2001; Fong et al., 2008).

O EGFR faz parte de uma família de receptores de transmembrana, com atividade tirosina quinase cuja ativação leva ao crescimento e diferenciação celular normal, desempenhando também um papel na oncogênese (Rautava et al., 2008). Estudos realizados por Laimer et al. (2007) utilizando a imunistoquímica demonstraram que o EGFR estava superexpresso em 73,4% da amostra de CCEB. Nos estudos realizados por Diniz-Freitas et al. (2007) os autores encontraram ausência de marcação para o EGFR em 2,1% dos CCEB, imunomarcação fraca em 23,4% dos casos e imunomarcação moderada ou forte em 74,5% dos CCEB. Nagatsuka et al. (2001) encontraram o gene EGFR amplificado em 20% dos CCEB estudados.

No presente trabalho, dos 48 casos de leucoplasia, 18 (37,5%) apresentaram-se negativos para o EGFR e 30 (62,5%) positivos para o EGFR, diferindo de outros autores (Srinivasan e Jewel, 2001; Rautava et al., 2008). Quando este resultados são comparados aos encontrados por Srinivasan e Jewel (2001), podemos inferir que essa diferença possa ter ocorrido em função do ponto de corte utilizado. Uma vez que os autores citados acima não descreveram qual porcentagem de imunomarcação seria considerada positiva para seus casos, podemos imaginar uma porcentagem muito baixa ou até mesmo uma ausência de ponto de corte. Não há um consenso na literatura quanto ao valor desse ponto de corte. Galizia et al. (2006) em um estudo com EGFR em câncer de cólon utilizaram um ponto de corte de apenas 1%. Acreditamos que o ponto de corte de 10% utilizado em neste trabalho como proposto por Diniz-Freitas et al. (2007) seja um bom valor. Este sistema foi utilizado em outros trabalhos na literatura para análise do EGFR em CCEB, sendo também consideradas negativas as amostras com marcação para o EGFR inferior a 10% (Rautava et al., 2008).

Os achados relativos ao EGFR em leucoplasias são escassos na literatura e os resultados não conclusivos (Srinivasan e Jewel, 2001; Rautava et al., 2008; Nagatsuka et al., 2001). Além disso, de um modo geral, os autores

apresentaram apenas o resultado da análise comparativa entre os casos de leucoplasia e o controle ou entre a leucoplasia e o CCEB, sem no entanto caracterizar a amostra em relação à quantidade de casos positivos para o EGFR. Srinivasan e Jewel (2001) foram dos poucos autores que descreveram a amostra estudada. No trabalho os autores encontraram que os 17 casos de leucoplasias avaliados (100% da amostra), apresentaram-se positivos para o EGFR. Os autores descreveram que a análise da imunexpressão foi feita através de imagem digitalizada, que abrangia uma margem específica de pixels e uma determinada resolução, mas não descreveram qual a porcentagem de pixels usada como ponto de corte para se considerar uma lâmina positiva ou negativa. Rautava et al. (2008) observaram a imunomarcção para o EGFR em leucoplasias em aproximadamente metade da amostra (o total de casos constava de 23 leucoplasias), sendo negativas as imunomarcções inferiores a 10% do epitélio.

Um outro fator que pode relacionar-se a diferenças de imunomarcção das lesões, é a diferença de tamanho entre as amostras. A seleção adequada de casos retirados de arquivos muitas vezes torna-se um ponto de limitação do estudo, uma vez que muitos casos são perdidos por ausência de informação nas fichas, tamanho das amostras parafinizadas ou mesmo ausência das mesmas.

São poucos os trabalhos em leucoplasia que trazem o ponto de corte utilizado na análise da imunomarcção. Rautava et al. (2008) utilizaram o mesmo ponto de corte que este estudo (10%). No entanto a diferença de resultados da imunexpressão do EGFR pode ter ocorrido pela diferença entre as amostras de cada trabalho. Enquanto o presente estudo avaliou 48 casos, a amostra dos autores constou apenas de 23 casos de leucoplasia, quase a metade desta amostra. Além disso, os autores não incluíram no trabalho casos de hiperqueratose, mas apenas casos com atipia leve, moderada ou severa. Acreditamos que amostras muito pequenas podem ser insuficientes para avaliação das diferenças entre grupos. Além disso a omissão de um grupo em que a alteração estudada é gradativa entre eles pode mascarar o resultado (Wang et al., 2002).

O primeiro critério avaliado em relação ao EGFR foi a atipia epitelial. A atipia epitelial foi, por muitos anos, considerada como o mais importante fator preditivo da transformação maligna em leucoplasias (van der Wall et al., 1997; Werkmeister e Brandt, 1999) e alguns trabalhos ainda hoje consideram a displasia como um importante fator preditivo de malignidade (Duarte et al., 2008; Thomson et al., 2008; Montebugnoli et al., 2008). No entanto, em termos práticos, apesar de importante, a validade da graduação é questionável (Reibel et al., 2003; Holmstrup et al., 2006). Ainda que leucoplasias com atipia moderada ou severa tenham maior chance de transformação maligna (van der Wall et al., 1997; Liu e Klein-Szanto, 2000) a malignização também pode ocorrer em lesões sem atipia (Shin et al., 1994; Reibel, et al., 2003; Teresa et al., 2007; Montebugnoli et al., 2008).

Além disso, a avaliação da atipia é subjetiva, podendo haver discordância entre os avaliadores quanto ao grau de atipia epitelial (Pindborg et al., 1985; Abbey et al., 1995; Abbey, et al., 1998; Reibel et al., 2003).

Neste trabalho os 48 casos da amostra foram divididos quanto à graduação histológica da seguinte forma: 5 casos classificados como hiperplasia, 23 casos como atipia discreta e 20 como atipia moderada.

A distribuição dos casos quanto ao grau de atipia difere mesmo entre trabalhos que avaliaram amostras de tamanho similar, em especial quanto à prevalência da atipia severa. Saito et al. (1999) encontraram entre, 57 casos, 11 (19,30%) com atipia severa, enquanto que Takeda et al. (2006) encontraram 13 (30,26%) casos de atipia severa em uma amostra de 43 lesões. Além da subjetividade, outros fatores associados à característica da amostra (gênero, localização e tabagismo) devem ser considerados para explicar essa diferença.

Este trabalho procurou avaliar a associação da proliferação entre a graduação histológica de atipia e a expressão do EGFR. Da mesma forma que Rautava et al. (2008), não foi encontrada associação entre o grau de atipia e a positividade para o EGFR. Isso talvez reforce o fato de que as alterações histológicas, sozinhas, não possam ser consideradas indicadores confiáveis de transformação conforme sugerido em trabalhos anteriores.

Por outro lado, as alterações na expressão do EGFR talvez não sejam tão significativas nesta fase da carcinogênese. As alterações induzidas pela superexpressão deste receptor talvez estejam sendo equilibradas por fatores que buscam proteger o epitélio contra a transformação maligna (Kövesi e Szende, 2006) ou ainda o processo de cancerização pode estar sendo orquestrado por outros genes comprovadamente associados com as chances de transformação maligna da leucoplasia (Duarte et al., 2008).

O desenvolvimento da leucoplasia tem sido fortemente associado ao consumo do cigarro (Moreno-López et al., 2000; Hashibe et al., 2003) ainda que haja discordância (Holmstrup et al., 2006) e faltem estudos que avaliem o real impacto da interrupção do hábito de fumar sobre o risco de transformação maligna da leucoplasia (Lodi e Poter, 2008; Roosaar et al., 2007).

Alguns trabalhos também sugerem que o consumo do cigarro possa estimular a proliferação celular pela via do EGFR, especialmente através do estímulo à síntese e liberação dos ligantes do EGFR (Du et al., 2005; Du et al., 2007; Brown e Kane, 2006), em especial, a anfirregulina (Du et al., 2005).

Neste trabalho não se encontrou uma relação de associação entre o EGFR e o consumo do tabaco nos pacientes com leucoplasia bucal. Um fator não analisado e que pode ter interferido nesta associação é a capacidade de degradação dos metabólitos do cigarro pelas células epiteliais. Em geral, estes metabólitos são detoxificados pelas GSTs (Glutathione S-Transferase) tornando-se inativados e sendo eliminados do organismo. Em pacientes com leucoplasias, apesar de o polimorfismo existir, em relação aos genes dessas enzimas (Duarte et al., 2008), não se pode dizer com precisão até que ponto houve alteração nesse processo de detoxificação. Pode ser que a ação desta enzima em pacientes com leucoplasia reduza os metabólitos do cigarro a níveis insuficientes para estimular a produção de ligantes do EGFR. A quantificação do consumo de tabaco pelos pacientes, também não foi analisado no presente estudo. Talvez a quantidade de tabaco consumida possa interferir na capacidade de neutralização dos metabólitos do cigarro.

O fato de alguns trabalhos mostrarem a relação do cigarro com alterações celulares (Du et al., 2005; Du et al., 2007), outros evidenciarem a superexpressão do EGFR em CCE (Shin et al., 1994) e o presente trabalho não encontrar a relação do EGFR com o tabagismo, não descarta a hipótese de que o tabaco pode relacionar-se a acúmulos genéticos celulares necessários ao processo de malignização. O aumento da transcrição da anfirregulina ocasionada pelo cigarro, levando à estimulação do EGFR, sugere que outros trabalhos são necessários para elucidar essa associação.

Diversos estudos apontam as regiões de soalho bucal e língua como sendo os de maior risco para a transformação maligna das leucoplasias (Van der Waal et al., 1997; Liu e Klein-Szanto, 2000; Van der Waal et al., 2000; Reibel, 2003; Greer, 2006; Lee et al., 2006). Ainda que outros estudos incluam outras localizações (Bouquot e Whitaker, 1994; Van der Waal et al., 2000; Zhang et al., 2001) nenhum deles exclui língua e soalho bucal sendo que, dessa forma, as duas regiões são pontos comuns entre todos os trabalhos. Além disso, trabalhos mostram que essas regiões de língua e soalho bucal são as de maior incidência de CCEB (Scully e Poter, 2000), apresentando um pior prognóstico para o CCEB do que as demais localizações (Greer, 2006) e que essas duas regiões estão mais expostas aos carcinógenos diluídos na saliva do que as outras regiões da boca (Reibel, 2003). Assim, no presente trabalho também foram consideradas as lesões de língua e soalho bucal como lesões de alto risco e aquelas nas demais localizações como baixo risco.

A associação encontrada no nosso trabalho entre o EGFR e a localização pode reforçar esta idéia, podendo realmente indicar um maior potencial de malignidade para as lesões localizadas em língua e soalho bucal.

Apesar de Rautava et al. (2008) não terem encontrado associação entre a expressão de receptores c-erbB e o epitélio de origem das leucoplasias, hipotetizou-se que nas regiões de soalho bucal e língua, por serem regiões muito vascularizadas e permeáveis aos carcinógenos, possa haver uma maior estimulação dos receptores c-erbB por estas substâncias, levando à sua maior expressão. Reibel (2003) reforça essa idéia sugerindo que essas áreas são

consideradas como de maior permeabilidade e, além disso, a língua e soalho são as regiões ficam expostas por mais tempo ao carcinógenos do cigarro que se diluem na saliva. Além disso, pode-se hipotetizar também que essas regiões não proporcionam barreiras físicas que dificultem a proliferação celular e crescimento da lesão.

Zhang et al. (2001) apontam em seu estudo que as regiões consideradas como sendo de alto risco apresentam maior perda de heterozigosidade em genes relacionados à supressão tumoral do que regiões de baixo risco. O presente trabalho não apresentou como objetivo o estudo genético relacionado às leucoplasias, mas acredita-se que trabalhos voltados para a biologia molecular são de extrema importância para uma melhor compreensão desta associação.

Alterações na atividade proliferativa de leucoplasias podem anteceder as alterações histopatológicas de atipia e informar sobre os riscos de transformação maligna (Liu e Klein-Szanto, 2000). No presente trabalho verificou-se a associação do Ki-67 ao EGFR e com os diferentes graus de atipia epitelial.

Embora o EGFR e o Ki-67 sejam ambos marcadores de proliferação celular, eles atuam por diferentes vias da proliferação e poucos são os estudos que avaliam leucoplasia e esses dois marcadores. Rautava et al. (2008) em seu trabalho não encontraram correlação entre o EGFR e o Ki-67 em leucoplasias. Neste estudo não foi encontrada associação entre os índices de marcação para o Ki-67 e o EGFR. Desta forma são necessários mais estudos sobre o assunto uma vez que ainda são escassos na literatura.

Alguns estudos também avaliaram as diferenças epiteliais entre as várias graduações histológicas pela imunomarcagem para o Ki-67. Teresa et al. (2007) encontraram diferença entre os índices de Ki-67 nas diferentes graduações histológicas de atipia em leucoplasias. No entanto, os autores compararam a graduação dividindo as amostras em dois grupos, um sem displasia e outro com displasia, formado por hiperkeratoses com atipia epitelial leve, moderada e severa.

Rautava et al. (2008) também relataram encontrar diferenças na proliferação celular entre as diferentes graduações histológicas de atipia em seu trabalho. No entanto, entre as leucoplasias os autores não incluíram casos de hiperqueratose.

Thomson et al. (2008) encontraram diferenças significativas entre a atipia moderada e atipia severa para o Ki-67.

O presente trabalho não encontrou associação entre o Ki-67 e a graduação histológica. Talvez este resultado tenha sido diferente dos outros autores em função da diferença na distribuição dos casos em cada grau de atipia (Teresa et al., 2007; Rautava et al., 2008) principalmente pela ausência de casos com atipia epitelial severa em nossa amostra. Talvez, a avaliação do Ki-67 entre os extremos da graduação torne mais perceptível a diferença de proliferação celular entre as diferentes graduações histológicas.

Apesar da ausência de associação mostrada neste trabalho, acredita-se que o Ki-67 pode ser útil nos estudos de proliferação celular em leucoplasias. Esta relação entre a graduação histológica da leucoplasia e a imunomarcagem para o Ki-67 já foi evidenciada em diversos trabalhos (Takeda et al., 2006; Gonzalez-Moles et al., 2000; Saito et al., 1999; Jordan et al., 1998), sugerindo que o Ki-67 possa ser usado como um bom marcador de atividade proliferativa.

O p27 é um inibidor quinase dependente de ciclina (CDKI) que inibe a proliferação celular e induz a apoptose. O p27 é uma das CDKIs que regula as CDKs, impedindo que elas induzam a fosforilação necessária à progressão do ciclo celular (Jordan et al., 1998). A Cdk2 é uma proteína que se torna ativada na fase G1 e atua na fosforilação da p27 na região Thr187, criando uma região de interação entre a p27 e a Skp2, uma proteína ubiquitina-ligase. Essa proteína ubiquitina a p27, permitindo a degradação da mesma. Quando a fosforilação ou ubiquitinização não são eficientes, não há degradação da p27. Dessa forma, as células mantêm-se fora do ciclo celular, impedindo que as células passem de G1 para S (Besson et al., 2006; Lee e Kay, 2007). No entanto, parece existir outra população de p27 que atua impedindo que as células passem da fase G0 para G1. Nessa fase a fosforilação da p27 ocorre

na região Ser10 e parece ser independente da via da ubiquitina, representada pela Skp2 (Lee e Kay, 2007). Alguns trabalhos relatam redução na expressão do p27 em leucoplasias bucais quando comparada com epitélio normal e com o CCEB (Tsuzuki et al., 2003). Estes autores encontraram ainda que a expressão do p27 no CCEB diminui com o agravamento da neoplasia.

Em trabalhos experimentais têm demonstrado que a administração de inibidores de tirosina quinase para o EGFR (Gefinitib) leva a uma inibição da proliferação celular neoplásica por estímulo do aumento de p27 e à redução na unidade ubiquitina-ligase, a Skp2 (Shintani et al., 2007).

Outro estudo utilizando um inibidor do EGFR, o Iressa (ZD1839), também encontrou que esta droga induz a parada celular na fase G1, pelo aumento do RNAm da p27 e também relacionaram o p27 à Skp2 (Lee et al., 2007 B).

Ben-Izhak et al. (2005) demonstraram uma associação entre a alta expressão do Her-2 e os baixos níveis de p27. A redução nos níveis de p27 tem sido atribuída a uma degradação aumentada da via da ubiquitina. A Skp2 é uma subunidade da ubiquitina E3, que se liga ao p27 e a leva à degradação.

Observou-se, neste estudo, uma associação entre a expressão do EGFR e os índices de p27 quando avaliado o epitélio como um todo. Embora não tenha sido estudada a relação entre EGFR, p27 e Skp2, o resultado vem de acordo com os resultados de Shintani et al. (2007) e Lee et al. (2007 B). Essa associação parece indicativa de que altos níveis de EGFR podem levar a um aumento na proliferação celular por uma ação sobre um dos inibidores do ciclo celular, o p27.

O p27 já foi previamente avaliado em leucoplasias bucais. Kövesi e Szende (2006) encontraram diferenças entre a expressão do p27 entre diferentes tipos clínicos de leucoplasias. Saito et al. (1999) também observaram uma diminuição da expressão do p27 com o aumento da proliferação celular. Jordan et al. (1998) também encontraram uma diminuição da imunomarcagem do p27 com o aumento da atipia epitelial.

Foram encontradas diferenças nos índices para p27 nos diferentes graus de atipia com significância estatística entre os casos de atipia discreta e moderada. Observou-se que a média e a mediana da imunomarcação para o p27 diminuíram com o aumento da graduação histológica. Ou seja, à medida que a graduação histológica aumenta, menor é a expressão de p27, mostrando, portanto, uma maior capacidade de proliferação celular.

Os resultados deste trabalho não permitem propor o EGFR como marcador da transformação maligna em leucoplasias. No entanto, aponta caminhos que devem ser melhor investigados, tais como a associação do tabaco com o EGFR e com a proliferação celular, a associação do EGFR com o p27 e suas vias proteolíticas. No futuro, o melhor entendimento destas questões poderá levar a novas estratégias terapêuticas no manejo das lesões cancerizáveis, talvez incluindo os inibidores do EGFR.

8) Conclusões

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir:

- 1) EGFR está expresso em leucoplasias independentemente do grau histológico de atipia.
- 2) A expressão do EGFR nas leucoplasias avaliadas não mostrou associação com o tabagismo.
- 3) Parece haver uma maior expressão do EGFR em leucoplasias localizadas em língua e soalho bucal.
- 4) Não foi encontrada uma relação entre a expressão do EGFR e Ki-67 em leucoplasias bucais.
- 5) Foi encontrada uma associação entre EGFR e p27 sendo que, o maior número de casos positivos para o p27 foram encontradas entre as lesões negativas para o EGFR.
- 6) Nesta amostra, a proliferação celular avaliada pelo Ki-67 não esteve associada à atipia epitelial.
- 7) Nesta amostra, os índices de p27 mostraram associação com a atipia epitelial, com tendência à redução na expressão desta proteína em lesões de maior atipia.

9) Referências Bibliográficas

ABBEY, L.M.; KAUGARS, G.E.; GUNSOLLEY, J.C.; BURNS, C.; PAGE, D.G.; SVIRSKY, J.A.; EISENBERG, E.; KRUTCHKOFF, D.J. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod.** 80(2):188-91, 1995.

ABBEY, L.M., KAUGARS, G.E.; GUNSOLLEY, J.C.; BURNS, C.; PAGE, D.G.; SVIRSKY, J.A.; EISENBERG, E.; KRUTCHKOFF, D.J.; CUSHING, M. The effect of clinical information on the histopatologic diagnosis of oral epithelial dysplasia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 85(1):74-7, 1998.

BAGÁN, J.V., MURILLO, J.; POVEDA, R.; GAVALDÁ, C.; JIMÉNEZ, Y.; SCULLY, C. Proliferative verrucous leukoplakia: unusual locations of oral squamous cell carcinomas, and field cancerization as shown by the appearance of multiple OSCCs. **Oral Oncology.** 40(4):440-3, 2004.

BEN-IZHAK, O.; KABLAN, F.; LASTER, Z.; NAGLER, R.M. Oropharyngeal cancer pathogenesis: ubiquitin proteolytic, apoptotic and epidermal growth factor related pathways act in concert--first report. **Oral Oncol.** 41(8):851-60, 2005.

BESSON, A.; GURIAN-WEST, M.; CHEN, X.; KELLY-SPRATT, K.S.; KEMP, C.J.; ROBERTS, J.M. A pathway in quiescent cells that controls p27kip1 stability, subcellular localization and tumor suppression. **Genes Dev.** 20(1):47-64, 2006.

BIRCHALL, M.A.; SCHOCK, E.; HARMON, B.V.; GOBÉ, G. Apoptosis, mitosis, PCNA and bcl-2 in normal, leukoplakic and malignant epithelia of the human oral cavity: prospective, in vivo study. **Oral Oncol.** 33(6):419-25, 1997.

BOUQUOT, J.E. e WHITAKER, S.B. Oral leukoplakia - Rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or "phases". **Quintessence Internacional.** 25(2):133-40, 1994.

BRAAKHUIS, B.J.M.; LEEMANS, C.R.; BRAKENHOFF, R.H. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. **J Oral Pathol Med.** 33(6):317-22, 2004.

BROWN, KS E KANE, MA. Chemoprevention of squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Otolaryngol Clin N Am.** 39(2):349-63, 2006.

CABAY, RJ, MORTON, TH JR E EPSTEIN, JB. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. **J Oral Pathol Med.** 36(5):255-61, 2007.

CALDEIRA, E.J.; CARVALHO, C.A.; PADOVANI, C.R.; CAMILLI, J.A.; GARCIA, P.J.; CAGNON, V.H. Morphological alterations in the epithelium of the oral mucosa of rats (*Rattus norvegicus*) submitted to long-term systemic nicotine treatment. **Archives of Oral Byology.** 52(1):83-9, 2007.

DE PAULA, A.M. e GOMEZ, R.S. Immunolocalization of p53, glutathione S-transferase pi and CD57 antigens in oral leukoplakia. **Anticancer Research**. 21(1A):379-85, 2001.

DINIZ-FREITAS, M.; GARCÍA-CABALLERO, T.; ANTÚNEZ-LÓPEZ, J.; GÁNDARA-REY, J.M.; GARCÍA-GARCÍA, A. Pharmacodiagnostic evaluation of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma. **Oral Disease**. 13(3):285-90, 2007.

DU, B.; LEUNG, H.; KHAN, K.M.; MILLER, C.G.; SUBBARAMAIAH, K.; FALCONE, D.J.; DANNENBERG, A.J. Tobacco smoke induces urokinase-type plasminogen activator and cell invasiveness: evidence for an Epidermal Growth Factor Receptor - dependent mechanism. **Cancer Res**. 67(18):8966-72, 2007.

DU, B.; ALTORKI, N.K.; KOPELOVICH, L.; SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A.J. Tobacco smoke stimulates the transcription of amphiregulin in human oral epithelial cells: evidence of a AMP-responsive element binding protein-dependent mechanism. **Cancer Res**. 65(13):5982-8, 2005.

DUARTE, E.C.B.; RIBEIRO, D.C.; GOMEZ, M.V.; RAMOS-JORGE, M.L.; GOMEZ, R.S. Genetic polymorphisms of carcinogen metabolizing enzymes are associated with oral leukoplakia development and p53 overexpression. **Anticancer Research**. 28(2A):1101-6, 2008.

EPSTEIN, J.B.; ZHANG, L.; Rosin, M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. **J Can Assoc**. 68(10):617-21, 2002.

FILHO, G.B.; PEREIRA, F.E.; GUIMARÃES, R.C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular In: **Bogliolo Patologia**. Geraldo Brasileiro Filho. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2006. - 7 edição.

FONG, Y.; CHOU, S.J.; HUNG, K.F.; WU, H.T.; KAO, S.Y. An investigation of the differential expression of Her2/neu gene expression in normal oral mucosa, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma in Taiwan. **J Clin Med Assoc** 71(3):123-7, 2008.

GALIZIA, G.; LIETO, E.; FERRARACCIO, F.; DE VITA, F.; CASTELLANO, P.; ORDITURA, M.; IMPERATORE, V.; LA MURA, A.; LA MANNA, G.; PINTO, M.; CATALANO, G.; PIGNATELLI, C.; CIARDIELLO, F. Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in colon cancer patients undergoing curative surgery. **Annals of Surgical Oncology**. 13(6):823-35, 2006.

GARCIA, A.S.; ABAD-HERNÁNDEZ, M.M.; FONSECA-SÁNCHEZ, E.; CRUZ-HERNÁNDEZ, J.J.; BULLÓN-SOPELANA, A. Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakias. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. 10(1):5-8, 2005.

GONZALES-MOLES, M.; RUIZ-AVILA, I.; RODRIGUEZ-ARCHILLA, A.; MARTINEZ-LARA, I. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for

the presence and severity of oral epithelial dysplasia. **Head & Neck.** 22(7):658-61, 2000.

GIROD, S.C.; PFEIFFERT, P.; RIES, J.; PAPET, H.-D. Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. **Br J Oral Maxillofac Surg.** 36(4):252-60, 1998.

GREER, R.O. Pathology of malignant and premalignant oral epithelial lesions. **Otolaryngologic clinics of north america.** 39(2):249-75, 2006.

HANSEN, L.S.; OLSON, J.A.; SILVERMAN, S. JR. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 60(3):285-98, 1985.

HASHIBE, M.; JACOB, B.J.; THOMAS, G.; RAMADAS, K.; MATHEW, B.; SANKARANARAYANAN, R.; ZHANG, Z.F. Socioeconomic status, lifestyle factors and oral premalignant lesions. **Oral Oncology.** 39(7):664-71, 2003.

HOLMSTRUP, P.; VEDTOFTE, P.; REIBEL, J.; STOLTZE, K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncology.** 42(5):461-74, 2006.

HOLMSTRUP, P.; VEDTOFTE, P.; REIBEL, J.; STOLTZE, K. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? **J Oral Pathol Med.** 36(5):262-6, 2007.

HSUE, S.S.; WANG, W.C.; CHEN, C.H.; LIN, C.C.; CHEN, Y.K.; LIN, L.M. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosa disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. **J Oral Pathol Med.** 36(1):25-9, 2007.

IARC. Tobacco smoke and involuntary smoking Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 83, 2002.

JORDAN, R.C.K.; BRADLEY, G.; SLINGERLAND, J. Reduced levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip in epithelial dysplasia and carcinoma of the oral cavity. **American Journal of Pathology.** 152(2):585-90, 1998.

KLEINMAN, D.V.; SWANGO, P.A.; PINDBORG, J.J.; GUPTA, P. Toward assessing trends in oral mucosal lesions: lessons learned from oral cancer. **Adv Dent Res.** 7(1):32-41, 1993.

KLEINMAN, D.V.; SWANGO, P.A.; NIESSEN, L.C. Epidemiologic studies of oral mucosal conditions - methodologic issues. **Community Dent Oral Epidemiol.** 19(3):129-40, 1991.

KÖVESI, G. e SZENDE, B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. **J Oral Pathol Med.**, 35(5):274-7, 2006.

LAIMER, K.; SPIZZO, G.; GASTL, G.; OBRIST, P.; BRUNHUBER, T.; FONG, D.; BARBIERI, V.; JANK, S.; DOPPLER, W.; RASSE, M.; NORER, B. High

EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. **Oral Oncology**. 43(2):193-8, 2007.

LEE, J.G. e KAY, E.P. Two populations of p27 use differential kinetics to phosphorylate Ser-10 and Thr-187 via phosphatidylinositol 3-Kinase in response to fibroblast growth factor-2 stimulation. **J Biol Chem**. 282(9):6444-54, 2007.

LEE, J.E.; WHANG, J.H.; JEON, N.K.; KIM, J. The epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 (Iressa) supresses proliferation and invasion of human oral squamous carcinoma cells via p53 independent and MMP, uPAR dependent Mechanism. **Ann NY Acad Sci**. 1095, 113-128, 2007 B.

LEE, J.J.; HUNG, H.C.; CHENG, S.J.; CHEN, Y.J.; CHIANG, C.P.; LIU, B.Y.; JENG, J.H.; CHANG, H.H.; KUO, Y.S.; LAN, W.H.; KOK, S.H. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: prevalence and risk factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 101(4):472-80, 2006.

LEE, J.J.; HUNG, H.C.; CHENG, S.J.; CHIANG, C.P.; LIU, B.Y.; YU, C.H.; JENG, J.H.; CHANG, H.H.; KOK, S.H. Factors associated with underdiagnosis from incisional biopsy of oral leukoplakic lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 104(2):217-25, 2007 A.

LING, Y .H.; LI, T.; YUAN, Z.; HAIGENTZ, M. JR.; WEBER, T.K.; PEREZ-SOLER, R. Erlotinib, an effective epidermal growth fact receptor tyrosine kinase inhibitor, induces p27 up-regulation and nuclear translocation in association with cell growth inhibition and G1/S phase arrest in human non-small-cell lung cancer lines. **Mol pharmacol**. 72(2):248-58, 2007.

LIU, S.C. e KLEIN-SZANTO, A.J.P. Markes of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncology**. 36(2):145-51, 2000.

LODI, G. e POTER, S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. **J Oral Pathol Med**. 37(2):63-9, 2008.

MARQUES, L.J.; TESCHLER, H.; GUZMAN, J.; COSTABEL, U. Smoker´s lung transplant to a nonsmoker. **Am J Resp Crit Care Med**. 156(5):1700-2,1997.

MILLER, R.T.; KUBIER, P.; REYNOLDS, B.; HENRY, T.; TURNBOW, H. Blocking of endogenous avidin-biotin activity in immunohistochemistry. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**. Vol. 7, pp. 63-5, 1999.

MONTEBUGNOLI, L.; FELICETTI, L.; GISSI, D.B.; CERVELLATI, F.; SERVIDIO, D.; MARCHETTI, C.; PRATI, C.; FLAMMINIO, F.; FOSCHINI, M.P. Predictive role of p53 protein as a single marker or associated to Ki67 antigen in oral carcinogenesis. **The Open Dentistry Journal**. 2, 24-9, 2008.

MORENO-LÓPEZ, L.A.; ESPARZA-GÓMEZ, G.C.; GONZÁLEZ-NAVARRO, A.; CERERO-LAPIEDRA, R.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, M.J.; DOMÍNGUEZ-ROJAS, V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol

consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. **Oral Oncology**. 36(2):170-4, 2000.

NAGATSUKA, H.; ISHIWARI, Y.; TSUJIGIWA, H.; NAKANO, K. Quantitation of epidermal growth factor receptor gene amplification by competitive polymerase chain reaction in pre-malignant and malignant oral epithelial lesions. **Oral Oncology**. 37(7):599-604, 2001.

ODANI, T.; ITO, D.; LI, M.H.; KAWAMATA, A.; ISOBE, T.; IWASE, M.; NAGUMO, M. Gene expression profiles of oral leukoplakias and carcinoma: genome-wide comparison analysis using oligonucleotide microarray technology. **Int J Oncol**. 28(3):619-24, 2006.

ÖZDEMİR, B.H.; ÖZDEMİR, O.G.; SERTÇELİK, A. The prognostic importance of the nucleolar organizer region (AgNOR), Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in primary nonurachal bladder adenocarcinoma. **APMIS**. 109(6):428-34, 2001.

PINDBORG, J.J.; REIBEL, J.; HOLMSTRUP, P. Subjective in evaluation oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. **J Oral Pathol**. 14(9):698-708, 1985.

RAUTAVA, J.; JEE, K.J.; MIETTINEN, P.J.; NAGY, B.; MYLLYKANGAS, S.; ODELL, E.W.; SOUKKA, T.; MORGAN, P.R.; HEIKINHEIMO, K. ERBB receptors in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. **Oral Oncology**. 44(3):227-35, 2008.

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

ROOSAAR, A.; YIN, L.; JOHANSSON, A.L.; SANDBORGH-ENGLUND, G.; NYRÉN, O.; AXÉLL, T. A long-term follow-up study on the natural course of oral leukoplakia in a Swedish population-based sample. **J Oral Pathol Med**. 36(2):78-82, 2007.

SAITO, T.; NAKAJIMA, T.; MOGI, K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. **J Oral Pathol Med**. 28(5):226-32, 1999.

SCHEPMAN, K.P.; VAN DER WAAL, I. A proposal for a classification and staging system for oral leukoplakia: a preliminary study. **Oral Oncol, Eur J Cancer**. 31B(6):396-8, 1995.

SCHOELCH, M.L.; REGEZI, J.A.; DEKKER, N.P.; NG, I.O.; McMILLAN, A.; ZIOBER, B.L.; LE, Q.T.; SILVERMAN, S.; FU, K.K. Cell Cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**. 35(3):333-42, 1999.

SCULLY, C. e PORTER, S. ABC of oral health. **BMJ**. 321(7253):97-100, 2000.

SHIN, D.M.; RO, J.Y.; HONG, W.K.; HITTELMAN, W.N. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. **Cancer Research**. 54(12):3153-9, 1994.

SHINTANI, S.; LI, C.; MIHARA, M.; YANO, J.; TERAOKA, N.; NAKASHIRO, K.; HAMAKAWA, H. Gefitinib ('Iressa', ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, up-regulates p27kip1 and induces G1 arrest in oral squamous cell carcinoma cell lines. **Oral Oncology**. 40(1):43-51, 2004.

SRINIVASAN, M. e JEWELL, S.D. Evaluation of TGF- α and EGFR expression in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis by quantitative immunohistochemistry. **Oncology**. 61(4):284-92, 2001.

TAKEDA, T.; SUGIHARA, K.; HIRAYAMA, Y.; HIRANO, M.; TANUMA, J.I.; SEMBA, I. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. **J Oral Pathol Med**. 35(6):369-75, 2006.

TERESA, D.B.; NEVES, K.A.; NETO, C.B.; FREGONEZI, P.A.; DE OLIVEIRA, M.R.; ZUANON, J.A.; DONADI, E.A.; MENDES-JUNIOR, C.T.; SOARES, C.P. Computer-assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions. **Acta Histochem**. 109(5):377-87, 2007.

THOMSON, P.J.; HAMADAH, O.; GOODSON, M.L.; CRAGG, N.; BOOTH, C. Predicting recurrence after oral precancer treatment: use of cell cycle analysis. **Brit J Oral Maxillofac Surg**. 46(5):370-5, 2008.

TRADATI, N.; GRIGOLAT, R.; CALABRESE, L.; COSTA, L.; GIUGLIANO, G.; MORELLI, F.; SCULLY, C.; BOYLE, P.; CHIESA, F. Oral leukoplakias: to treat or not? **Oral Oncology**. 33(5):317-21, 1997.

TSAO, A.S.; KIM, E.S.; HONG, W.K. Chemoprevention of cancer. **A Cancer Journal for Clinicians**. 54(3):150-80, 2004.

TSUZUKI, H.; FUJIEDA, S.; SUNAGA, H.; NARITA, N.; TOKURIKI, M.; SAITO, H. Expression of p27 and apoptosis in oral leukoplakia. **Anticancer Research**., 23(2B):1265-70, 2003.

VAIRAKTARIS, E.; LOUKERI, S.; VASSILIOU, S.; NKENKE, E.; SPYRIDONIDOU, S.; VYLLIOTIS, A.; PAPAKOSTA, V.; LAZARIS, A.; AGROGIANNIS, G.; YAPIJAKIS, C.; PERREA, D.; PATSOURIS, E. Egfr and c-Jun exhibit the same pattern of expression and increase gradually during the progress of oral oncogenesis. **In Vivo**., 21(5):791-6, 2007.

VAN DER WAAL, I.; SCHEPMAN, K.P.; VAN DER MEIJ, E.H. A modified classification and staining system for oral leukoplakias. **Oral Oncology**., Vol. 36, pp. 264-66. 2000.

VAN DER WAAL, I.; SCHEPMAN, K.P.; VAN DER MEIJ, E.H.; SMEELE, L.E. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. **Oral Oncol**. 33(5):291-301, 1997.

VERHEIJEN, R.; KUIJPERS, H.J.; VAN DRIEL, R.; BECK, J.L.; VAN DIERENDONCK, J.H.; BRAKENHOFF, G.J.; RAMAEKERS, F.C. Ki-67 detects

a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen II. Location in mitotic cells and association with chromosomes. **J Cell Sci.** 92 (4):531-40, 1989.

WANG, C.H.; JENG, J.S.; YIP, P.K.; CHEN, C.L.; HSU, L.I.; HSUEH, Y.M.; CHIOU, H.Y.; WU, M.M.; CHEN, C.J. Biological Gradient Between Long-Term Arsenic Exposure and carotid atherosclerosis. **Circulation.** 105(15):1804-9 2002.

WARNAKULASURIYA, S; PARKKILA, S; NAGAO, T; PREEDY, VR; PASANEN, M; KOIVISTO, H; NIEMELÄ, O. Demonstration of ethanol-induced protein adducts in oral leukoplakia (pre-cancer) and cancer. **J Oral Pathol Med.**, 37(3):157-65, 2008.

WERKMEISTER, R. e BRANDT, B. Aberrations of erbB-1 and erbB-2 oncogenes in non-dysplastic leukoplakias of the oral cavity. **British J Oral and Maxillofacial Surg.**, 37(6):477-80, 1999.

YANG, Y.H.; CHEN, C.H.; CHANG, J.S.; LIN, C.C.; CHENG, T.C.; SHIEH, T.Y. Incidence rates of oral cancer and oral pre-cancerous lesions in a 6-year follow-up study of a Taiwanese aboriginal community. **J Oral Pathol Med.**, 34(10):596-601, 2005

YEUDALL, W.A. e JAKUS, J. Cyclin kinase inhibitors add a new dimension to cell cycle control. **Oral Oncol, Eur J Cancer.**, 31B(5):291-8, 1995.

ZHANG, L.; CHEUNG, K.J. JR.; LAM, W.L.; CHENG, X.; POH, C.; PRIDDY, R.; EPSTEIN, J.; LE, N.D.; ROSIN, M.P. Increased genetic in oral leukoplakia from high risk sites. **Cancer.** 1;91(11):2148-55, 2001.

ZHU, C-Q.; SHIH, W.; LING, C.H.; TSAO, M.S. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. **J Clin Pathol.**, 59(8):790-800, 2006.

10) Anexos

10.1) Caracterização da amostra quanto ao gênero, atipia, tabagismo, localização e idade

Caso	Gênero	Atipia	Tabagismo	Localização	Idade (anos)
1	Masculino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	65
2	Feminino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	25
3	Masculino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	49
4	Masculino	Atipia Discreta	Fumante	Baixo Risco	60
5	Masculino	Atipia Discreta	Fumante	Alto risco	52
6	Feminino	Atipia Discreta	Não fumante	Alto risco	42
7	Masculino	Hiperkeratose	Fumante	Baixo Risco	76
8	Masculino	Atipia Discreta	Fumante	Baixo Risco	43
9	Masculino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	42
10	Masculino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	37
11	Masculino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	44
12	Masculino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	38
13	Masculino	Atipia Discreta	Fumante	Baixo Risco	54
14	Masculino	Atipia Discreta	Fumante	Baixo Risco	54
15	Masculino	Atipia Moderada	Não fumante	Alto risco	68
16	Masculino	Hiperkeratose	Fumante	Baixo Risco	49
17	Masculino	Atipia Discreta	Não fumante	Alto risco	56
18	Masculino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	59
19	Masculino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	32
20	Masculino	Atipia Discreta	Fumante	Baixo Risco	61
21	Feminino	Atipia Discreta	Fumante	Baixo Risco	48
22	Feminino	Hiperkeratose	Fumante	Baixo Risco	39
23	Feminino	Atipia Discreta	Não fumante	Alto risco	78

24	Masculino	Atipia Discreta	Fumante	Baixo Risco	71
25	Feminino	Atipia Discreta	Fumante	Baixo Risco	45
26	Feminino	Atipia Discreta	Fumante	Baixo Risco	27
27	Masculino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	51
28	Feminino	Atipia Discreta	Não fumante	Alto risco	72
29	Feminino	Atipia Discreta	Fumante	Baixo Risco	51
30	Masculino	Atipia Discreta	Fumante	Alto risco	40
31	Masculino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	61
32	Feminino	Atipia Discreta	Fumante	Alto risco	53
33	Feminino	Atipia Discreta	Fumante	Baixo Risco	45
34	Masculino	Hiperkeratose	Fumante	Alto risco	62
35	Masculino	Atipia Moderada	Fumante	Baixo Risco	42
36	Feminino	Atipia Moderada	Não fumante	Alto risco	75
37	Feminino	Atipia Moderada	Não fumante	Alto risco	69
38	Feminino	Atipia Moderada	Não fumante	Baixo Risco	73
39	Feminino	Atipia Discreta	Não fumante	Baixo Risco	50
40	Feminino	Atipia Discreta	Não fumante	Baixo Risco	53
41	Masculino	Atipia Moderada	Não fumante	Alto risco	65
42	Masculino	Atipia Discreta	Não fumante	Baixo Risco	24
43	Feminino	Atipia Discreta	Não fumante	Alto risco	65
44	Feminino	Atipia Discreta	Não fumante	Baixo Risco	72
45	Feminino	Atipia Moderada	Não fumante	Baixo Risco	36
46	Masculino	Hiperkeratose	Não fumante	Baixo Risco	42
47	Feminino	Atipia Moderada	Não fumante	Baixo Risco	60
48	Masculino	Atipia Moderada	Não fumante	Alto risco	52

10.2) Caracterização da amostra quanto à imunomarcagem para o EGFR,

Ki-67 e p27

Caso	EGFR	KiBPerc	KiPbPerc	KiSbPerc	KiTerc	p27BPerc	p27PbPerc	p27SbPerc	p27TPerc
1	Positivo	26,03	33,56	14,31	24,82	2	8,1	39,03	16,89
2	Positivo	47,29	24,26	2,09	24,94	1,13	4,56	8,46	4,68
3	Negativo	23,76	39,66	10,35	24,97	1,53	8,66	53,99	22,68
4	Negativa	19,88	45,05	5,26	23,66	2,46	13,14	46,12	22,5
5	Positivo	37,36	45,6	12,58	31,08	0,97	7,85	56,87	21,88
6	Positivo	12,75	33,85	7,59	16,96	2,91	3,14	44,72	18,37
7	Negativo	60,28	45,91	21,31	42,09	3,77	11,52	57,06	24,41
8	Negativo	18,01	35,06	2,14	18,26	14,18	46	35,51	32,09
9	Negativo	24,37	36,67	0,96	20,64	2,72	2,76	33,33	13,58
10	Positivo	49,33	44,54	5,42	32,99	5,36	12,87	16,79	11,67
11	Negativa	20,27	42,99	8,98	23,06	1,74	5,15	42,25	16,18
12	Negativa	76,27	45,5	7,59	42,51	2,67	7,24	64,68	26,27
13	Negativo	21,51	28,82	7,08	18,67	1,27	14,57	66,67	28,39
14	Negativo	22,05	36,12	7,66	22,2	0,17	6,16	56,65	23,01
15	Positivo	31,55	26,39	0,77	19,93	0	0	27,95	9,27
16	Negativo	15,4	14,57	5,76	11,72	7,02	10,61	49,2	23,15
17	Positivo	39,18	56,56	9,45	34,11	3,88	8,58	75,55	30,37
18	Positivo	19,28	30,28	9,4	19,67	4,95	7,66	53,5	21,63
19	Negativo	37,23	25,69	0,32	19,65	5,14	16,93	59,14	27,28
20	Positivo	11,05	33,4	2,63	15,72	7,23	7,99	51,98	24,1
21	Positivo	18,88	29,36	8,72	19,17	2,56	17,35	53,68	27,22
22	Positivo	7,58	50,36	3,79	19,83	2,42	7,63	71,88	26,44
23	Positivo	11,24	40,14	5,5	18,8	2,89	8,56	32,34	14,31
24	Positivo	55,69	39,49	5,18	32,73	2,31	24,31	73,47	33,86

25	Negativo	20,1	62,65	4,48	29,33	0,39	2,68	56,36	22,62
26	Negativo	15,7	29,53	6,6	17,38	7,5	17,41	64,36	28,25
27	Positivo	23,46	33,4	0,79	18,05	2,76	5,1	48,34	17,92
28	Positivo	49,21	57,61	9,72	38,87	1,39	4,84	57,44	22,76
29	Negativo	56,06	60,16	9,89	40,98	9,5	28,42	74,63	37,96
30	Positivo	43,92	63,25	11,82	39,49	1,33	3,47	37,45	13,59
31	Positivo	26,89	40,83	11,66	25,93	0	0,78	17,51	6,42
32	Positivo	88,46	54,97	6,87	48,2	5,33	16,57	50	25,15
33	Positivo	16,09	35,05	13,58	21,48	0,54	6,12	33,03	12,98
34	Positivo	30,88	55,89	6,71	30,04	6,5	20,6	69,03	32,35
35	Positivo	65,67	46,03	10,78	40,13	2,08	2,36	25,7	9,88
36	Positivo	14,95	23,51	16,21	18,11	3,53	3,94	23,11	10,74
37	Positivo	37,79	42,78	4,1	28,37	1,12	0,8	22,06	8,66
38	Positivo	45,81	56,12	20,81	41,98	3,18	3,36	35,8	14,35
39	Positivo	35,49	56,52	1,85	30,73	3,13	6,39	67,97	25,2
40	Positivo	43,53	32,76	0,93	25,38	6,69	6,27	38,95	17,45
41	Negativo	73,58	30,1	3,62	35,49	0,76	3,07	63,19	21,58
42	Positivo	23,63	30,38	3,35	19,56	2,04	4,1	25,7	10,39
43	Negativo	13,24	39,18	8,17	19,94	0,2	0,18	14,96	5,16
44	Negativo	36,41	46,48	10,31	31,92	0,38	1,44	34,78	12,98
45	Negativo	36,74	40,04	4,5	27,98	0,38	2,8	46,47	17,01
46	Positivo	13,91	27,47	17,89	19,75	2,36	3,44	31,01	11,56
47	Positivo	60,73	39,04	5,82	34,07	1,33	5,94	40	15,78
48	Positivo	18,57	51,8	14,58	27,6	3,59	4,57	58,94	23,57

10.3) Aprovação do projeto de pesquisa pelo COEP / UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Parecer nº. ETIC 48/08

Interessado(a): **Profa. Maria Cássia Ferreira de Aguiar**
DCPCO
Faculdade de Odontologia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 2 de abril de 2008, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação imunoistoquímica do EGFR/Her-1 em leucoplasias bucais e de sua associação com as proteínas Ki-67 e p27**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

2ª via

10.4) Artigo científico

An investigation of the differential expression of EGFR in oral leukoplakia

Leukoplakia is a common lesion of the oral mucosa which is defined as a white patch or plaque that cannot be characterized clinically or pathologically as any other disease (WHO, 1978). Oral leukoplakia is the most common precancerous lesion of the oral cavity. On biopsy, some of these may exhibit epithelial dysplasia, one of the prognostic factors with reference to their possible malignant transformation (Srinivasan and Jewel, 2001; Odani et al., 2006; Roosaar et al., 2007). Other features have also been reported to be associated with an increased risk of malignant transformation such as smoking (Saito et al., 1999; Reibel, 2003; Hashib et al., 2003; Lee et al., 2006; Greer, 2006; Brown e Kane, 2006; Tsao et al., 2007; Hsue et al., 2007) and location in the floor of the mouth or / and in the tongue (Schepman e Van der Waal, 1995; Van der Waal et al., 1997; Reibel, 2003; Greer, 2006).

Several studies have attempted to identify biomarkers that would be useful in predicting malignant transformation. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a member of a family of tyrosine kinase receptor that plays an important role in the control of cell proliferation (Nagatsuka et al., 2001). It is overexpressed in several types of cancers (Ruiz et al., 2007) including the oral squamous cell carcinoma (OSCC) (Shin et al., 2004; Vairaktaris et al., 2007; Rautava et al., 2008). There is increased evidence that the high expression of EGFR is correlated with advanced tumor stage, metastasis and poor clinical outcome of common human cancers (Shintani et al., 2004). Previous studies also indicated that EGFR deregulation might be a useful marker for identifying individuals at risk of OSCC development (Shin et al., 1994; Werkmeister e Brandt, 1999).

The exact mechanisms involved in the control of cellular proliferation through EGFR pathway are not totally elucidated. Recently, the results of preclinical studies targeting the EGFR have shown that tyrosine kinase inhibitor

that blocks the EGFR tyrosine kinase activity, inhibited cell proliferation and upregulated p27 in OSCC cells (Shintani et al., 2004, Lee et al., 2007).

The aim of the present study was to evaluate the immunexpression of EGFR in a sample of oral leukoplakias and its relation with the degree of oral dysplasia, tobacco consumption, location and to the proliferation rates, employing immunohistochemistry for Ki-67 and p27 antigens.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection

All lesions were retrieved from the files of the Oral Pathology Service, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil. Clinical records of each case were evaluated and all the cases were associated with tobacco use. All the cases were separated according to the site (high and low risk). The specimens were classified histopathologically into four groups according to epithelial dysplasia (absence, mild, moderate, severe), according to De Paula and Gomez (2001).

Immunohistochemistry (IHC)

IHC reactions for detection of EGFR, Ki-67 and p27 antigens were performed using monoclonal antibodies clone 31G7 (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, UK), MIB-1 (Dako, Carpinteria, USA) and SX5368 (Dako, Carpinteria, USA), respectively. Briefly, 4µm sections were dewaxed in xilene and hydrated with graded ethanol. Blocking of endogenous peroxidase and avidin-biotin activity were performed (Miller et al., 1999). Different protocols of antigen retrieval were employed. The antigen retrieval for EGFR was performed with pepsin 10% at 37°C. For Ki-67 and p27, the sections were placed in a steamer containing 10 µm citric acid, pH=6,0 for 20 min and Tris/EDTA, pH=8,0 buffer, for 20 min respectively. The primary antibody for EGFR and Ki-67 were incubated for 18H at room temperature, diluted 1:100. Antibody for p27

was incubated for 18H at 4° C, diluted 1:150. All dilutions employed 1% bovine serum albumine.

After washing in the Tri-HCl buffer , sections were incubated for 30 minutes at room temperature with biotinylated multi-link swine anti-goat, mouse and rabbit immunoglobulin (LSAB Kit, Daco, Carpinteria, CA, USA)The reaction were revealed by applying diaminobenzidine tetrahydrochloride (solid, DMBA). The sections were counter stained with Mayer`s hematoxylin and mounted in Permount (Fisher Scientific, NJ, USA). Sections of fibrous hyperplasia were used as EGFR and Ki-67 positive controls. Sections of normal lymph node and tonsil were used as positive control for p27. Negative controls were obtained by the omission of the primary antibody.

Evaluation of IHC

EGFR expression was evaluated by the extent and intensity of EGFR imunolabeling in the cell membranes and classified in a four-point scale 0 (no labeling or labeling <10% of epithelial cells), 1 (weak labeling, >10%), 2 (moderate labeling, >10%), 3 (intense labeling, >10%). For data analysis, these categories were grouped into two groups, 0 (absent or weak labeling -0,1) and 1 (moderate and intense-1,2). (Diniz- Freitas et al., 2007)

The nuclear expression of Ki-67 and p27 was counted according to epithelial layers as the basal layer (nuclei positive just above the basement membrane), parabasal layer (nuclei positive within two layers above the basement membrane) and suprabasal layer (nuclei positive in a more upper layer above the parabasal layer).

The percentages of positively stained nuclei for Ki-67 and p27 in 500 epithelial cell nuclei in each layer were calculated as the labeling index (LI) (Takeda et al., 2006).

Based in the Ki-67 and p27 expression levels in oral epithelium (Montebugnoli et al., 2008) we decided on a cut-off value of 20%. This value was used to the analysis of the association between EGFR with Ki-67 and p27. For the analysis of differences of cell proliferation between grades of dysplasia were used the mean LIs in each layer.

RESULTS

Of the 48 cases analysed, 28 were from male and 20 were from female. Ages ranged from 24 to 78 years, mean age 53 years. Considering the anatomic location, 34 were on low risk site and 14 on high risk site. About the tobacco consumption, 30 patients were smokers and 18 non-smokers. The samples were classified histologically as 5 epithelial hyperkeratosis with absence of dysplasia, 23 mild dysplasia and 20 moderate dysplasia.

The EGFR was detected in 30 cases. The location of staining was membranous and involved basal and suprabasal layers. There were no differences between different grades of dysplasia or between smokers and nonsmokers. There were differences between leukoplakias of high and low risk in accordance with EGFR positivity. EGFR immunoexpression showed a difference between positive and negative cases for p27. No difference was found to Ki-67 (Table 1).

Indices for Ki-67 did not show significant difference among the grades of dysplasia (Table 2). In contrast, indices for p27 were different according to the grade of dysplasia (Table 3).

Table 1 – Expression of EGFR according to tobacco smoking, location, epithelial dysplasia degree, and cell proliferation

		EGFR		p Value
		Negative	Positive	
Tobacco	Nonsmoking	4	14	0,090*
	Smoking	14	16	
Risk area	Low risk area	16	18	0,033*
	High risk area	2	12	
Epithelial dysplasia degree	Absence of dysplasia	2	3	1,000°
	Mild dysplasia	9	14	
	Moderate dysplasia	7	13	
LI Ki-67 (all layers)	≥20%	12	19	0,815*
	<20%	6	11	
LI Ki-67 (basal layers)	≥20%	13	20	0,688*
	<20%	5	13	
LI Ki-67 (parabasal layers)	≥20%	17	30	0,375°
	<20%	1	0	
LI Ki-67 (suprabasal layers)	≥20%	1	1	1,000°
	<20%	17	29	
LI p27 (all layers)	≥20%	13	12	0,031*
	<20%	5	18	
LI p27 (basal layers)	<20%	18	30	a
LI p27 (parabasal layers)	≥20%	2	2	0,624°
	<20%	16	28	
LI p27 (suprabasal layers)	≥20%	17	27	1,000°
	<20%	1	3	

* Pearson chi-square

°Fisher`s test

a – no statistical analysis

Table 2 – Mean value of Ki-67 labeling index (LI) in epithelial layers of leukoplakias

	KiBPerc[°]	KiPbPerc*	KiSbPerc[°]	KiTerc[°]
	Median	Mean	Median	Median
Absence of dysplasia	15,40	38,84	6,71	19,83
Mild dysplasia	22,05	43,13	7,08	23,66
Moderate dysplasia	34,14	37,65	6,70	25,45
p Value	0,116	0,286	0,670	0,713

*ANOVA °Kruskal-Wallis test

Table 3 – Mean value of p27 labeling index (LI) in epithelial layers of leukoplakia

	p27BPerc[°]	p27PbPerc[°]	p27SbPerc*	p27TPerc*
	Median	Median	Mean	Mean
Absence of dysplasia	3,77	10,61	55,63	23,58
Mild dysplasia	2,46	7,85	49,96	22,19
Moderate dysplasia	2,04	4,56	39,01	15,80
p Value	0,220	0,035	0,048	0,014

*ANOVA °Kruskal-Wallis test

DISCUSSION

In this study, we evaluated by immunohistochemistry, the differential expression of EGFR in a group of oral leukoplakias.

The role played by ERBB receptors in the progression of normal oral epithelium to OSCC is not yet understood (Rautava et al., 2008). Studies relating to EGFR levels and out comes in cases of oral dysplasia are contradictory. Srinivasan and Jewel, (2001) reported 100% of positivity in the group of leukoplakia evaluated for EGFR immunostaining. However these authors did not defined a cut-off value for EGFR. Rautava et al., (2008) used a cut-off value of 10% and found 50% of leukoplakias positive for EGFR. Applying the same values, 62,5% of our sample was positive for EGFR immunostaining.

On the other hand, independently of the values, all the studies evaluating EGFR in oral dysplastic tissues described positive cells for EGFR in the prickle cell layer in addition to the basal cell layer, comparing with the normal epithelium. This finding was also described in our study (Shirasuna et al., 1991; Shin et al., 1994; Srinivasan and Jewel, 2001; Rautava et al., 2008).

Some studies also described an increased of EGFR immunoexpression in leukoplakias with increasing degrees of dysplasia (Shin et al., 1994; Srinivasan and Jewel, 2001). However, in the present study there were no differences between different grades of dysplasia. Rautava et al., (2008) did not also find an association, but they suggest determination of EGFR status in each case of oral epithelial dysplasia nevertheless. The authors believe that this evaluation may aid assessment of possible benefits of EGFR – blocking molecular therapy.

The practical value of the grading of epithelial dysplasia is questionable. Although leukoplakias with severe dysplasia show a greater disposition for malignant transformation than in the absence of dysplastic features, carcinomatous transformation may also take place in non-dysplastic leukoplakias (Shin et al., 1994; van der Wall et al., 1997; Reibel, 2003; Teresa

et al., 2007). So, we believe that EGFR should be a promising histological marker improving on histopathologic evaluation of leukoplakia.

In several studies on malignant transformation, the borders of the tongue and floor of the mouth have been mentioned as so-called high-risk sites. (WHO, 1978; Schepman e Van der Waals, 1995; Van der Waal et al., 1997; Reibel, 2003; Greer, 2006). However, others subsites besides borders of the tongue and floor of the mouth may be considered high-risk sites (Gupta et al., 1990; Bouquot and Whitaker, 1994; Zhang et al., 2001). In the present work, we considered a high-risk site tongue and floor of the mouth, considering a significantly higher percentage of premalignant lesions at these locations that progress into carcinoma compared with the other oral sites. A recent study (Zhang et al. 2001) also showed that leukoplakia at high-risk oral sites exhibited more advanced molecular changes (LOH) than were suggested by the histologic findings, which were similar to those of lesions from lower risk sites in the oral cavity. Our study might reinforce the results of this molecular study. Differences were found in the EGFR expression between leukoplakias from high and low risk sites.

Tobacco smoking is the strongest independent risk factor for leukoplakia (Dietrich et al., 2004). These authors showed that there was a clear dose-response relationship for cigarette smoking, lending credibility to the generally accepted causal role of cigarette smoking in the pathogenesis of oral leukoplakias. However EGFR expression was not different in leukoplakias from smokers and non smokers. Since some studies have shown tobacco smoking inducing several EGFR ligands leading to EGFR stimulation (Du et al., 2005; Du et al., 2007), we recommend that this topic should be better investigated in a prospective study.

An increased proliferation in oral leukoplakia has been reported (Liu and Klein-Szanto, 2000; Saito et al., 1999; Gonzales-Moles et al., 2000; Takeda et al., 2006; Kövesi and Szende, 2006). Our results were very similar to Rautava et al., (2008). The MIB-1 value did not correlate with corresponding EGFR staining or with the histopathological degree of dysplasia. However, we also

observed an extended suprabasal expression of Ki-67 in leukoplakia (Gonzales-Moles et al., 2000), and although difference was not found, this event was more pronounced in dysplastic epithelium.

A reduction in the expression of p27 in oral leukoplakia has been described in some studies (Jordan et al., 1998; Tsuzuki et al., 2003; Kövesi e Szende, 2006). In the present study 23 (48%) of leukoplakias were negative for 27.

The CDK inhibitor p27^{Kip1} plays an important role in the G2 arrest by binding and inhibiting G1 cyclin – CDK complex and negatively regulating progression through G1 and S phases of the cell cycle. Reduced levels of p27 have been reported in a number of human tumors and have been associated with aggressive histological behavior (Jordan et al., 1998).

The levels of p27 are regulated mainly via post-transcriptional mechanisms, including ubiquitin-proteasome-mediated proteolysis (Tsuzuki et al., 2003). Ben-Izhak et al. (2005) found a correlation between the expression levels of p27, c-cerbB2 and skp-2. The reduction in the expression of p27 in OSCC was correlated with increased expression of c-erbB 2.

There was a difference between p27 positive and negative leukoplakias expressing EGFR. Previous studies have shown that inhibitor of EGFR causes an increase in p27 expression in culture cells of OSCC. Our results appear to confirm these findings and also suggest that studies about EGFR inhibitors may have various clinical applications in the future treatment of cancer.

There was an association between p27 and the grade of epithelium dysplasia. There was a reduction of p27 expression with the increase of dysplasia This result is in accordance with others (Tsuzuki et al., 2003; Kövesi e Szende, 2006) suggesting that alterations in p27 expression appear to precede the invasive stages of oral tumorigenes, reflecting changes in growth controls of dysplastic cells. The implication of these findings warrants additional investigation.

In conclusion, EGFR is expressed in oral leukoplakia, in special in that localized in floor of the mouth and tongue. The association of p27 with oral carcinogenesis and EGFR remains to be elucidated, which may have an important biological significance.

REFERENCES

- 1) WHO Colaborating centre for oral precancerous lesion: definition of leukoplakia and related lesions:an aid to studies on oral precancerous **lesions**. **Oral Surg**46:518-39, 1978.
- 2) SRINIVASAN, M. e JEWELL, S.D. Evaluation of TGF-a and EGFR expression in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis by quantitative immunohistochemistry. **Oncology**. 61(4):284-92, 2001.
- 3) ODANI, T.; ITO, D.; LI, M.H.; KAWAMATA, A.; ISOBE, T.; IWASE, M.; NAGUMO, M. Gene expression profiles of oral leukoplakias and carcinoma: genome-wide comparison analysis using oligonucleotide microarray technology. **Int J Oncol**. 28(3):619-24, 2006.
- 4) ROOSAAR, A.; YIN, L.,; JOHANSSON, A.L.; SANDBORGH-ENGLUND, G.; NYRÉN, O.; AXÉLL, T. A long-term follow-up study on the natural course of oral leukoplakia in a Swedish population-based sample. **J Oral Pathol Med**. 36(2):78-82, 2007.
- 5) SAITO, T.; NAKAJIMA, T.; MOGI, K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. **J Oral Pathol Med**. 28(5):226-32, 1999.
- 6) REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histological, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Biol Med**. 14(1):47-62, 2003.
- 7) HASHIBE, M.; JACOB, B.J.; THOMAS, G.; RAMADAS, K.; MATHEW, B.; SANKARANARAYANAN, R.; ZHANG, Z.F. Socioeconomic status, lifestyle factors and oral premalignant lesions. **Oral Oncology**. 39(7):664-71, 2003.
- 8) GREER, R.O. Pathology of malignant and premalignant oral epithelial lesions. **Otolaryngologic clinics of north america**. 39(2):249-75, 2006.
- 9) BROWN, KS E KANE, MA. Chemoprevention of squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Otolaryngol Clin N Am**. 39(2):349-63, 2006.
- 10) TSAO, A.S.; KIM, E.S.; HONG, W.K. Chemoprevention of cancer. **A Cancer Journal for Clinicians**. 54(3):150-80, 2004.

- 11) HSUE, S.S.; WANG, W.C.; CHEN, C.H.; LIN, C.C.; CHEN, Y.K.; LIN, L.M. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosa disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. **J Oral Pathol Med**. 36(1):25-9, 2007.
- 12) SCHEPMAN, K.P.; VAN DER WAAL, I. A proposal for a classification and staining system for oral leukoplakia: a preliminary study. **Oral Oncol, Eur J Cancer**. 31B(6):396-8, 1995.
- 13) VAN DER WAAL, I.; SCHEPMAN, K.P.; VAN DER MEIJ, E.H.; SMEELE, L.E. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. **Oral Oncol**. 33(5):291-301, 1997.
- 14) NAGATSUKA, H.; ISHIWARI, Y.; TSUJIGIWA, H.; NAKANO, K. Quantitation of epidermal growth factor receptor gene amplification by competitive polymerase chain reaction in pre-malignant and malignant oral epithelial lesions. **Oral Oncology**. 37(7):599-604, 2001.
- 15) RUIZ, M.I.G.; FLOOR, K.; Vos, W.; GRÜNBER, K.; MEIJER, G.A.; RODRIGUES, J.A.; GIACCONE, G. Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number detection in non-small-cell lung cancer; a comparison of fluorescence *in situ* hybridization and chromogenic *in situ* hybridization. **Histopathology**. 51(5):631-7, 2007.
- 16) SHIN, D.M.; RO, J.Y.; HONG, W.K.; HITTELMAN, W.N. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. **Cancer Research**. 54(12):3153-9, 1994.
- 17) VAIRAKTARIS, E.; LOUKERI, S.; VASSILIOU, S.; NKENKE, E.; SPYRIDONIDOU, S.; VYLLIOTIS, A.; PAPAKOSTA, V.; LAZARIS, A.; AGROGIANNIS, G.; YAPIJAKIS, C.; PERREA, D.; PATSOURIS, E. Egfr and c-Jun exhibit the same pattern of expression and increase gradually during the progress of oral oncogenesis. **In Vivo**., 21(5):791-6, 2007.
- 18) RAUTAVA, J.; JEE, K.J.; MIETTINEN, P.J.; NAGY, B.; MYLLYKANGAS, S.; ODELL, E.W.; SOUKKA, T.; MORGAN, P.R.; HEIKINHEIMO, K. ERBB receptors in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. **Oral Oncology**. 44(3):227-35, 2008.
- 19) SHINTANI, S.; LI, C.; MIHARA, M.; YANO, J.; TERAKADO, N.; NAKASHIRO, K.; HAMAKAWA, H. Gefitinib ('Iressa', ZD1839), an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, up-regulates p27kip1 and induces G1 arrest in oral squamous cell carcinoma cell lines. **Oral Oncology**. 40(1):43-51, 2004.
- 20) WERKMEISTER, R. e BRANDT, B. Aberrations of erbB-1 and erbB-2 oncogenes in non-dysplastic leukoplakias of the oral cavity. **British J Oral and Maxillofacial Surg**., 37(6):477-80, 1999.
- 21) LEE, J.J.; HUNG, H.C.; CHENG, S.J.; CHIANG, C.P.; LIU, B.Y.; YU, C.H.; JENG, J.H.; CHANG, H.H.; KOK, S.H. Factors associated with underdiagnosis

from incisional biopsy of oral leukoplakic lesions. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 104(2):217-25, 2007.

22) DE PAULA, A.M. e GOMEZ, R.S. Immunolocalization of p53, glutathione S-transferase pi and CD57 antigens in oral leukoplakia. **Anticancer Research**. 21(1A):379-85, 2001.

23) DINIZ-FREITAS, M.; GARCÍA-CABALLERO, T.; ANTÚNEZ-LÓPEZ, J.; GÁNDARA-REY, J.M.; GARCÍA-GARCÍA, A. Pharmacodiagnostic evaluation of EGFR expression in oral squamous cell carcinoma. **Oral Disease**. 13(3):285-90, 2007.

24) DU, B.; LEUNG, H.; KHAN, K.M.; MILLER, C.G.; SUBBARAMAIAH, K.; FALCONE, D.J.; DANNENBERG, A.J. Tobacco smoke induces urokinase-type plasminogen activator and cell invasiveness: evidence for an Epidermal Growth Factor Receptor - dependent mechanism. **Cancer Res**. 67(18):8966-72, 2007.

25) DU, B.; ALTORKI, N.K.; KOPELOVICH, L.; SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A.J. Tobacco smoke stimulates the transcription of amphiregulin in human oral epithelial cells: evidence of a AMP-responsive element binding protein-dependent mechanism. **Cancer Res**. 65(13):5982-8, 2005.

26) TAKEDA, T.; SUGIHARA, K.; HIRAYAMA, Y.; HIRANO, M.; TANUMA, J.I.; SEMBA, I. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. **J Oral Pathol Med**. 35(6):369-75, 2006.

27) SHIRASUNA, K.; HAYASHIDO, Y.; SUGIYAMA, M.; YOSHIOKA, H.; MATSUYA, T. Immunohistochemical localization of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor in human oral mucosa and its malignancy. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**. 418(4):349-53, 1991.

28) GUPTA, P.C.; MEHTA, F.S.; DAFTARY, D.K.; PINDBORG, J.J.; BHONSLE, R.B.; JALNAWALLA, P.N.; SINOR, P.N.; PITKAR, V.K.; MURTI, P.R.; IRANI, R.R.; SHAH, H.T.; KADAM, P.M.; IYER, K.S.; IYER, H.M.; HEGDE, A.K.; CHANDRASHEKAR, G.K.; SHIROFF, B.C.; SAHIAR, B.E.; MEHTA, M.N. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. **Community Dent Oral Epidemiol**. 8(6):283-333, 1980.

29) BOUQUOT, J.E. e WHITAKER, S.B. Oral leukoplakia - Rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or "phases". **Quintessence Internacional**. 25(2):133-40, 1994.

30) ZHANG, L.; CHEUNG, K.J. JR.; LAM, W.L.; CHENG, X.; POH, C.; PRIDDY, R.; EPSTEIN, J.; LE, N.D.; ROSIN, M.P. Increased genetic in oral leukoplakia from high risk sites. **Cancer**. 1;91(11):2148-55, 2001.

31) DIETRICH, T.; REICHART, P.A.; SCHEIFELE, C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncol**. 40(2):158-63, 2004.

32) LIU, S.C. e KLEIN-SZANTO, A.J.P. Markes of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncology**. 36(2):145-51, 2000.

GREER, R.O. Pathology of malignant and premalignant oral epithelial lesions. **Otolaryngologic clinics of north america**. 39(2):249-75, 2006.

33) GONZALES-MOLES, M.; RUIZ-AVILA, I.; RODRIGUEZ-ARCHILLA, A.; MARTINEZ-LARA, I. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. **Head & Neck**. 22(7):658-61, 2000.

34) KÖVESI, G. e SZENDE, B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. **J Oral Pathol Med**., 35(5):274-7, 2006.

35) JORDAN, R.C.K.; BRADLEY, G.; SLINGERLAND, J. Reduced levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip in epithelial dysplasia and carcinoma of the oral cavity. **Americam Journal of Pethology**. 152(2):585-90, 1998.

36) TERESA, D.B.; NEVES, K.A.; NETO, C.B.; FREGONEZI, P.A.; DE OLIVEIRA, M.R.; ZUANON, J.A.; DONADI, E.A.; MENDES-JUNIOR, C.T.; SOARES, C.P. Computer-assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions. **Acta Histochem**. 109(5):377-87, 2007.

37) TSUZUKI, H.; FUJIEDA, S.; SUNAGA, H.; NARITA, N.; TOKURIKI, M.; SAITO, H. Expression of p27 and apoptosis in oral leukoplakia. **Anticancer Research**., 23(2B):1265-70, 2003.

38) BEN-IZHAK, O.; KABLAN, F.; LASTER, Z.; NAGLER, R.M. Oropharyngeal cancer pathogenesis: ubiquitin proteolytic, apoptotic and epidermal growth factor related pathways act in concert--first report. **Oral Oncol**. 41(8):851-60, 2005.