ALEXANDRA FONTES DA COSTA

**Estudo da mutação do gene *TP53* e análise da expressão
imuno-histoquímica de p53, Bcl2 e Fas em queilite actínica e
carcinoma epidermoide de lábio**

São Paulo

2010

Alexandra Fontes da Costa

**Estudo da mutação do gene *TP53* e análise da expressão
imuno-histoquímica de p53, Bcl2 e Fas em queilite actínica e
carcinoma epidermoide de lábio**

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

Área de concentração: Patologia Bucal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marília Trierveiler Martins.

São Paulo

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

Costa AF. Estudo da mutação do gene *TP53* e análise imuno-histoquímica de p53, Bcl2 e Fas em queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração de Patologia Bucal.

Aprovado em ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a).

Titulação:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof (a). Dr (a).

Titulação:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof (a). Dr (a).

Titulação:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof (a). Dr (a).

Titulação:_____

Julgamento:_____ Assinatura:_____

DEDICATÓRIA

Ao meu marido André, talvez precisasse de uns 4 anos para expressar tudo o que sinto por você, agradecer tudo o que você é para mim e tudo que você faz por mim. Por agüentar meu mau humor, minhas crises e minhas chatices. Por entender meu nervosismo durante alguns períodos críticos desta minha trajetória. Enfim, acho que dizer que te amo muito possa resumir tudo o que eu gostaria de dizer neste momento, mas não encontro palavras que consigam expressar totalmente todo meu agradecimento e amor.

À minha mãe Amélia, por simplesmente tudo que sou hoje, por ser uma mãe incrível e sempre me apoiar em tudo que fiz na vida. Também precisaria de muitos anos e muito papel para expressar todo o meu sentimento de amor, amizade e de conforto que tenho ao seu lado. Amo muito você.

Ao meu avô Manuel Matias, um homem de humilde formação escolar, mas que desde sempre deu uma enorme importância ao conhecimento. Mesmo em sua pequena aldeia em Portugal se empenhava em estudar a luz de velas durante a noite após um dia inteiro de trabalho, pois sabia a importância do estudo. Sempre me disse que o dinheiro, os bens e as terras o tempo, o ladrão ou governo podem levar, mas o teu

conhecimento ninguém tira. Infelizmente ele não está aqui para presenciar este grande momento da minha vida contudo sei que onde estiver estará com muito orgulho de mim.

.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Marília Trierveiler Martins, que não soe aqui como algo meramente formal, mas sim sinal de um imenso respeito e de uma profunda admiração, adquiridos após tantos anos de convívio profissional e pessoal. Posso dizer que me espelho profissionalmente em você, sempre que penso em como gostaria de ser como professora ou orientadora penso nas enormes qualidades que você tem nessas funções. Tenho muito orgulho de tê-la como orientadora, que nos momentos difíceis do laboratório sempre esteve presente, nunca me abandonou a própria sorte, não deixou que me perdesse em nenhum momento e que sempre me acompanhou de perto, muito perto. Se há uma coisa que não posso dizer é que me senti sozinha, pois sempre estava lá seu braço de orientadora e de professora. Aprendi muito como orientada, aprendi muito como aluna e espero continuar aprendendo com você. Obrigada por todos esses anos, por ter me iniciado na pesquisa e ter me ajudado a concluir todo esse caminho. Espero que esta parceria, que julgo eu ser muito bem sucedida, continue.

A **Deus** e **São Judas Tadeu** por sempre ouvirem minhas preces.

À professora **Marina** agradeço imensamente por não ter medido esforços para me ajudar em momentos críticos neste trabalho. Também pelos ensinamentos e convívio diários.

Aos professores, **Suzana, Fábio, Décio, Karen e Andréa**, pelos ensinamentos e convivência com cada um de vocês, o que torna o dia-a-dia sempre um grande aprendizado.

À minha mais que tudo amiga **Márcia**, a quem gosto de chamar de meu pezinho de coelho, por absolutamente tudo, pela amizade, pela paciência, pelo ouvido que escutou tanta reclamação, por ter me socorrido em dezenas de momentos durante este trabalho. Sem sombra de dúvidas teve uma participação importantíssima na execução do meu doutorado. Sempre serei grata e espero um dia poder retribuir tudo isso. Fico feliz por nossa amizade ficar cada vez mais forte, afinal nem a distância conseguiu enfraquecê-la, e espero fazer ainda muito mais parcerias com você porque a amizade já está garantida.

À **Juliana Schussel** e a **Patrícia** que assim como a Márcia foram pessoas importantíssimas para execução desse trabalho, ambas perderam dias e mais dias comigo no laboratório e sei que sofreram comigo todos os problemas. Mas apesar de todos os contratempos técnicos fico muito feliz de saber que tive ao meu lado pessoas tão incríveis e que não titubearam em me ajudar. Mais uma vez muito obrigada.

À minha irmã **Amélia** que além de irmã é também uma grande amiga e a grande culpada por eu ter caído no mundo da Odontologia. Obrigada por segurar as pontas dos meus pacientes principalmente agora no final quando estive completamente ausente. E obrigada ainda por ser a melhor irmã do mundo.

À minha grande amiga e comadre **Renata** pelas fofocas, pela amizade e por ser sempre a minha revisora de inglês. Por todos esses anos de amizade que é maior do que qualquer problema que possam nos atingir. Fico muito feliz de tê-la sempre ao meu lado nos nossos momentos bons e ruins. Obrigada por ser uma grande amiga.

Ao **Paulo** por todos os momentos maravilhosos que dividimos e também por estar ao meu lado nos momentos menos maravilhosos. Construímos uma amizade especial e que espero que dure para sempre. Agradeço também por me proporcionar a minha primeira experiência docente.

À **Luciana** por ser uma pessoa muito especial, sua calma sempre me fez bem, tudo podia estar desmoronando e você sempre muito centrada via o lado bom das coisas e com sua serenidade sempre me transmitiu paz. Fico feliz por termos construído uma amizade forte em tão pouco tempo.

Ao casal mais fofo da turma, **Márcio** e **Fabiana**, mesmo respeitando a individualidade de cada um é impossível pensar em vocês separados. São pessoas incríveis e fico muito de poder tê-los na minha vida.

À **Nathalie** pelos ótimos momentos que passamos juntas mas também pelas conversas sérias e de muitas reflexões.

Às fofíssimas, **Gabriela** e **Renata Caraméz**, por dividirmos nossas angústias e felicidades.

À **Thais** que embora esteja longe é uma amiga incrível pela qual sempre terei um carinho especial.

Um agradecimento especial a **Turma da Copa**, pois quando todos nós estamos reunidos são sempre momentos fantásticos que espero que continuem e que jamais esquecer.

Aos meus incríveis colegas de pós-graduação: **Aluna, Bruno, Fernanda, Fátima e Érika** pelos momentos de trabalho, mas também pelos momentos divertidíssimos que passamos na sala dos pós-graduandos.

Aos meus colegas de pós-graduação por dividir todos os momentos bons e ruins da pós-graduação.

À **Zilda** e a **Néia** que sempre foram pessoas queridas e que sempre me ajudaram em tudo que precisei.

Ao **Juvani** que me socorreu diversas no laboratório de biologia molecular.

À **Elisa, a Nair, Edna e Adriana** obrigada pela paciência e pela ajuda

À **Edna** que embora não esteja entre nós foi muito importante na minha iniciação laboratorial na pesquisa.

Ao meu irmão **Carlos**, meus cunhados **Edílson e Christiane** e minhas fofíssimas sobrinhas **Mariana, Camila e Carolina** por serem parte tão importante na minha vida.

À minha sogra **Neide** que é como uma segunda mãe pra mim, sempre disposta a minha ajudar em tudo fazendo mais coisas por mim do que eu mereço.

Aos meus grandes amigos **Francine, Wellington, Juliana Marotti, Aline, Robinson, Milena, Fabrício, Karina e Daniel** que embora não tenham uma participação direta na execução deste trabalho fazem parte da minha vida e uma parte muito feliz da minha, uma fim de semana juntos era o suficiente para espantar uma semana inteira de estresse.

À **Professora Dra. Miriam Turbino**, ao **Dr. Washington Steagall Jr** e a todos os membros do **grupo de apoio em bioestatística na Odontologia**

À **CAPES** e a **FAPESP** pela bolsa de estudos oferecida e pelo importante apoio financeiro para a pesquisa.

Costa AF. Estudo da mutação do gene *TP53* e análise imuno-histoquímica de TP53, Bcl2 e Fas em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

RESUMO

A radiação ultravioleta ao atingir os seres humanos em grande quantidade e durante uma longa exposição pode provocar danos específicos ao DNA, sendo causa de várias lesões como o carcinoma epidermoide de lábio e a queilite actínica, que é considerada uma lesão precedente ao aparecimento da primeira. Entre os danos causados pela radiação UV está a alteração genética do *TP53*, provocando anomalias na proteína por ele codificada. A produção da proteína p53 somente é recrutada em situações de estresse como: radiação ionizante, hipoxia ou ativação de oncogenes, nas quais sua função é regular o ciclo celular e ativar vias de apoptose. Contudo, sabe-se que no processo de carcinogênese não somente as alterações não reparadas do DNA são responsáveis pelo aparecimento de uma lesão. Outro fator de extrema importância nesse processo são os mecanismos de apoptose, entre os quais estão as vias do Bcl2 e do Fas. A queilite actínica normalmente é classificada segundo seus graus de displasia, o que para alguns sugeriria os passos percorridos por essa lesão até o carcinoma epidermoide de lábio já que esta lesão possui um potencial de malignização. Os resultados deste trabalho demonstraram que não há diferença estatística na expressão gênica e imuno-histoquímica de p53 entre os diversos graus de displasia. Demonstraram ainda que as vias de apoptose de Bcl2 e Fas estavam ocorrendo

normalmente. Sugere-se então que não há comprovação de que ocorra uma progressão para a malignização passando por todos os graus de displasia da queilite actínica tendo, todos a mesma possibilidade de se transformarem em um carcinoma epidermoide de lábio.

Palavras-chave: Queilite actínica. Carcinoma epidermoide de lábio. Imuno-histoquímica.
Mutação

Costa AF. Study of *TP53* gene mutation and immunohistochemical analysis of p53, Bcl2 e Fas expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

ABSTRACT

The long exposition of the human tissues to the ultraviolet radiation causes DNA damages and consequently several lesions might appear. Among them, lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis — which is considered to be a condition that precedes squamous cell carcinomas. The *TP53* mutation is a well-known effect of UV radiation, leading to the synthesis of an anomalous protein. The p53 production is only recruit in stress conditions like: ionizing radiation, hypoxia or oncogene activation, where it plays a role in cell cycle regulation and apoptosis activation. Apoptosis is also a fundamental mechanism associated to carcinogenesis. Bcl2 e Fas pathways are central in the regulation of this process. It is usual to classify the epithelial dysplasia degree in actinic cheilitis as a prognosticator. This type of classification suggests a one way path towards malignization. Our results have shown that there is no statistical difference in *TP53* status and p53 expression among the different degrees of actinic cheilitis epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. Based on the findings, there is no prove that the malignant transformation occurs as the epithelial dysplasia progresses. Therefore, should be considered that any degree has the same probability to become a lip squamous cell carcinoma

Keywords: Actinic cheilitis. Lip squamous cell carcinoma. Immunohistochemistry. Mutation

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3 PROPOSIÇÃO	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Casuística e análise morfológica	34
4.2 Classificação das queilites actínicas	35
4.3 Imuno-histoquímica	36
4.4 Extração de DNA	38
4.5 PCR	39
4.6 SSCP	40
4.7 Análise de resultados	41
5 RESULTADOS	42
5.1 MORFOLOGIA	42
5.2 p53	42
5.2.1 Carcinoma epidermoide de lábio	43
5.2.2 Queilite actínica	43
5.2.2.1 Classificação da OMS	43
5.2.2.1.1 <i>Queilite actínica com displasia discreta</i>	43
5.2.2.1.2 <i>Queilite actínica com displasia moderada</i>	44
5.2.2.1.3 <i>Queilite actínica com displasia discreta</i>	43
5.2.2.2 Classificação pelo sistema binário	44
5.2.2.2.1 <i>Queilite actínica de baixo risco</i>	45
5.2.2.2.2 <i>Queilite actínica de alto risco</i>	45
5.2.3 Eritélio normal	46
5.2.4 Análise estatística da expressão da proteína p53	46
5.3 BCL2	49
5.3.1 Carcinoma epidermoide de lábio	49
5.3.2 Queilite actínica	49
5.3.2.1 Classificação da OMS	49
5.3.2.1.1 <i>Queilite actínica com displasia discreta</i>	49
5.3.2.1.2 <i>Queilite actínica com displasia moderada</i>	50
5.3.2.1.3 <i>Queilite actínica com displasia intensa</i>	50
5.3.3.1 Classificação pelo sistema binário	51
5.3.3.1.2 <i>Queilite actínica de baixo risco</i>	51
5.3.3.1.3 <i>Queilite actínica de alto risco</i>	51
5.3.4 Eritélio normal	52
5.3.5 Análise estatística da expressão da proteína Bcl2	52
5.4 FAS	56
5.4.1 Carcinoma epidermoide de lábio	56
5.4.2 Queilite actínica	56
5.4.2.1 Classificação da OMS	56
5.4.2.1.1 <i>Queilite actínica com displasia discreta</i>	56

5.4.2.1.2 Queilite actínica com displasia moderada	57
5.4.2.1.3 Queilite actínica com displasia intensa.....	57
5.4.3.1 Classificação pelo sistema binário	58
5.4.3.1.1 Queilite actínica de baixo risco.....	58
5.4.3.1.2 Queilite actínica de alto risco.....	58
5.4.4 Epitélio normal	59
5.4.5 Análise estatística da expressão da proteína Fas	59
5.5- SSCP	62
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXO	85

1 INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento tecnológico e principalmente industrial da sociedade atual o mundo vem emitindo uma incontável e gigantesca quantidade de poluentes que conseqüentemente interferem drasticamente nas condições ambientais. A camada de ozônio — que pode ser considerada um filtro solar — protege o planeta da radiação ultravioleta (UV) do sol e vem, ao longo deste processo, sendo danificada, o que permite que uma quantidade maior de radiação atinja a superfície terrestre, trazendo conseqüências nocivas para os seres vivos. Somando-se a isso a exposição exagerada ao sol e a falta do uso de protetores solares, nota-se o aumento do número de casos de lesões que têm como fator etiológico os raios UV.

Dentre as lesões malignas que atingem seres humanos e que têm como fator etiológico a radiação UV, pode-se citar: o carcinoma basocelular, o carcinoma epidermoide e o melanoma. Existem, ainda, quadros considerados benignos, porém com potencial para cancerização, como a queratose actínica, que acomete a pele, e a queilite actínica, a correspondente em lábio. Essa última é considerada por muitos autores como um estágio que precede o aparecimento do carcinoma epidermoide em lábio. Devido a isso é imprescindível que esforços sejam feitos no intuito de esclarecer os mecanismos de indução, o comportamento biológico, o diagnóstico precoce e o tratamento dessas lesões, sejam elas precursoras de lesões malignas ou já malignas. Por isso, a proposta deste trabalho é estudar mutações no gene *TP53* possivelmente causadas pela ação da radiação ultravioleta, além de estudar alguns dos

desdobramento provocados por essa ação através do estudo da expressão das proteínas Fas e Bcl2 em lesões de queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Com a Revolução Industrial, no século XVIII, a industrialização trouxe consigo um incrível aumento do consumo de combustíveis fósseis — principalmente derivados de petróleo — que tem como consequência a geração de enorme quantidade de poluentes que são emitidos diariamente para a atmosfera terrestre. Embora esse processo venha acontecendo ao longo de vários séculos, somente a partir do século XX os cientistas começaram a se preocupar com os danos que esta emissão excessiva de poluentes causaria ao meio ambiente.

Em 1970 iniciaram-se os primeiros estudos relacionados ao gás clorofluorcarbono (CFC) usado em sprays aerossóis e geladeiras. Descobriu-se então que esse gás é capaz de causar danos à camada de ozônio na estratosfera e, já em 1982, observou-se uma área sobre a Antártida muito pobre em ozônio, com perda de cerca de 40% de sua composição (Organização não-governamental GREENPEACE). Um fato curioso que deve ser observado, é que a camada de ozônio, embora tenha apenas 3 mm de espessura, é a responsável por filtrar toda radiação que chega ao planeta, sendo que somente após a sua formação na estratosfera que a Terra passou a ser um ambiente viável à vida.

Do total da energia solar, cerca de 46% corresponde à luz visível, 45% à radiação infravermelha e apenas 9% à radiação ultravioleta (UV). Sendo essa última, entre todas, aquela que possui mais energia e que, conseqüentemente, é mais nociva aos seres vivos da Terra. Calcula-se que a camada de ozônio venha diminuindo em 0,5% ao ano e que a cada 1% perdido corresponderia a um aumento de 2% da

radiação UV que chega à superfície terrestre. No Brasil a perda da camada de ozônio já é estimada em 5% (INPE).

A radiação UV provoca danos específicos ao DNA, levando ao surgimento de várias lesões. No início do século XX, Hyde e Dulbrevilh, publicaram as primeiras evidências que relacionavam a exposição à radiação UV ao aparecimento do câncer de pele (Holzer et al., 2010). Assim como no câncer de pele, espera-se que alterações desse mesmo tipo devam ser encontradas no carcinoma epidermoide de lábio, devido à intensa radiação solar a qual ele também é exposto. Esse tipo de carcinoma representa a localização de 25 a 30% de todos os carcinomas orais, além de se apresentar como a lesão maligna mais comumente encontrada nessa região (Regezi; Sciubba, 2000). Já considerando os carcinomas epidermóides orais como um todo, correspondem a 3% dos casos de malignidades que afetam o ser humano, tendo elevada incidência na população mundial, ocupando a sexta posição entre as neoplasias malignas mais frequentes (Parkin et al., 1993). Segundo dados do INCA (Instituto nacional do câncer), estima-se que 14.120 pessoas sejam acometidas por algum tipo de carcinoma oral em 2010, sendo que desses, 10.330 serão homens e 3.790 mulheres. Em 2008, os carcinomas orais foram responsáveis por 6.214 mortes, sendo 4.898 homens e 1.316 mulheres. Segundo o próprio INCA, a mortalidade no Brasil para o câncer de boca seria em torno de 30%.

Ao exame clínico, o carcinoma epidermoide de boca pode se apresentar de diversas maneiras, podendo ser exofítico (formação de massa) ou endofítico (invasivo), leucoplásico (branco) ou eritoplásico (vermelho). Em geral, as lesões que apresentem somente alteração de coloração denotam um estágio inicial da lesão, já a mudança na

superfície é indicativa de destruição do tecido, ou seja, de que o tecido já está invadido. Quando a lesão é exofítica sua superfície tende a ser irregular, geralmente ulcerada, com ou sem alteração de cor. Já quando é endofítica ela possui uma área central ulcerada com borda de tecido normal de coloração branca ou vermelha. Especialmente na região do lábio, o carcinoma epidermoide pode se apresentar de uma maneira clinicamente mais branda. Não se observa comumente a formação clássica da ulceração de bordas elevadas e endurecidas. Normalmente ocorre uma mudança lenta dos aspectos normais do lábio como alteração da cor, do brilho, da elasticidade, endurecimento do lábio e presença ou não de ulceração (Picascia; Robinson, 1987; Nico et al., 2007; Cavalcante et al., 2008; Ulrich et al., 2010).

Quanto ao padrão histopatológico, o carcinoma epidermoide é uma neoplasia epitelial com ilhas e cordões de queratinócitos atípicos que rompem a membrana basal e invadem os tecidos adjacentes. No caso específico do carcinoma no lábio, pode-se observar no tecido conjuntivo adjacente, a presença da elastose solar. As células malignas podem atingir os tecidos ósseo, nervoso, muscular e adiposo além de vasos sanguíneos e linfáticos. Também podem ser notadas áreas focais de necrose. Em relação à diferenciação tumoral tem-se que quanto mais diferenciado é tumor menor sua agressividade, tendo assim uma relação inversa entre ela e o grau de diferenciação do tumor (Neville et al., 2004). O carcinoma epidermoide de lábio apresenta normalmente um grau de diferenciação mais elevado, o que levaria a uma menor agressividade, imperando um comportamento mais indolente se comparado com o carcinoma intraoral, além disso, acomete um tecido de transição, entre a mucosa oral e a pele, o que faz com que ele apresente características misturadas de ambos os sítios, tornando-o uma lesão de características bem próprias (Martinez et al., 2008).

Além de diversas características clínicas e histopatológicas próprias do carcinoma de lábio e que o diferem do carcinoma intraoral, temos também uma característica sua de suma importância: seu fator etiológico. O mais importante em relação a esse fator é que ele não é discriminador. Ao contrário do que acontece no carcinoma intraoral, cujo fator etiológico é o tabaco e previsivelmente seus usuários são mais acometidos por esta lesão, aqui qualquer ser humano independente de raça, gênero, nível sócio-econômico, etnia, religião ou cultura podem ser acometidos por esta lesão. Logicamente alguns fatores aumentarão ou diminuirão as chances de cada indivíduo em desenvolver a doença. Isto torna a prevenção um fator difícil, porque diversos fatores relacionados à radiação UV fogem ao controle do indivíduo. Assim, em relação a esse tipo de lesão, a preocupação maior deve ser em relação à melhora do diagnóstico precoce e o desenvolvimento de novos tratamentos e melhoria dos já existentes.

Felizmente, alguns sinais podem ser observados precocemente para que se evite o aparecimento da lesão maligna já instalada. Algumas lesões tidas como cancerizáveis, ou seja, que possuem um potencial de malignização, podem ser observadas em diversos casos. Especificamente no lábio, sabemos que a queilite actínica é considerada um estágio que precede o aparecimento do carcinoma epidermoide (Cockerrell, 2000). Alguns autores como Salasche (2000) afirmam existir em 97% dos carcinomas epidermoide de lábio correlação com a queilite actínica.

Acredita-se que entre 10 e 20% dos casos de queilite actínica sofrerão evolução para carcinoma epidermoide (Krunic et al., 1998), mas o espaço de tempo para que isso ocorra é imprevisível (de 1 a 20 anos); além disso tanto a avaliação clínica quanto

a avaliação histopatológica não fornecem dados prognósticos adequados para se traçar esta linha de evolução (Pindborg et al., 1985).

A queilite actínica é caracterizada por uma lesão de evolução lenta que acomete predominantemente o lábio inferior de indivíduos de pele clara, acima da quinta década de vida e que possuem um histórico de exposição crônica à radiação UV. Por isso é mais comumente verificada em profissões cuja exposição solar é elevada, como: agricultores, marinheiros e outras profissões (Neville et al., 2004). O caráter de evolução lenta mascara as alterações ocorridas no lábio, o que faz com que esses sinais não sejam notados pelo paciente, ou mesmo sejam confundidos com sinais do próprio envelhecimento, podendo ser esta uma das causas do grande número de biópsias revelando estágios mais avançados da doença.

Clinicamente a queilite actínica apresenta-se como uma lesão branca, local ou difusa, que pode exibir atrofia epitelial e/ou eritema, podendo ser acompanhada por ulcerações e vesículas (Picascia; Robinson, 1987) e deixando o lábio afetado com um aspecto pálido, atrófico e lustroso. A principal característica dessa lesão é a perda do limite mucocutâneo do lábio, representando uma degradação tecidual acelerada dos lábios, secundária à exposição solar (Cataldo; Doku, 1981). Assim como ocorre no carcinoma epidermoide de pele, a faixa populacional mais atingida é a de homens brancos por volta da sexta década de vida (Sanchez-Conejo-Mir et al., 1986), sendo sempre o lábio inferior o mais atingido.

Histologicamente a queilite actínica se apresenta por um epitélio pavimentoso estratificado atrófico ou hiperplásico com para ou ortoqueratose, de superfície em espessura variável. As displasias podem ser as mais variadas, desde uma displasia discreta, passando por moderada, intensa, podendo chegar até o carcinoma *in situ* já

instalado. O tecido conjuntivo subjacente invariavelmente mostra uma mudança basofílica, acelular e amorfa, conhecida como elastose solar (actínica), presumivelmente um resultado da alteração do colágeno e das fibras elásticas induzida pela luz UV, além do aparecimento de vasos telangiectásicos. Em geral se nota a presença de discreto infiltrado inflamatório adjacente ao epitélio (Neville et al., 2004; Regezi; Sciubba, 2000).

Assim como o carcinoma de lábio, a queilite actínica apresenta alterações em *TP53*. Porém os estudos ainda se mostram controversos quando se observa se as mesmas alterações são encontradas tanto na queilite actínica quanto no carcinoma.

O gene *TP53* é um supressor de tumor descoberto em 1979 (Lane; Crawford, 1979) e está localizado na posição 17q13.1, sendo composto por 11 exons, dos quais somente o primeiro não codifica a proteína (May; May, 1999). A p53 é uma proteína nuclear com peso de 53 KDa e com 393 aminoácidos. Possui quatro principais domínios funcionais sendo: um domínio de ativação transcripcional na porção N-terminal (aa 1-42); um domínio de ligação às sequências específicas do DNA na região central (aa 102-292); um domínio de oligomerização na parte C-terminal (aa 323-356); e um domínio de regulação (aa 360-393) (May; May, 1999).

Essa proteína se liga a sequências específicas do DNA, sendo um fator transcripcional controlador tanto positivo quanto negativo da expressão de diversos genes envolvidos em várias vias celulares. Uma das principais funções da p53 é se tornar um ponto de checagem na progressão da célula no ciclo celular. Da fase G1 para a fase S, e também da fase G para a fase M, garantindo assim a manutenção da integridade do DNA e impedindo que alterações genéticas se perpetuem (Acha-Sagredo et al., 2009; Wang; Harris, 1997; Levine et al., 1991).

Ao contrário da maioria de outros genes de supressão tumoral o *TP53* não é inativado pela perda alélica. Ele se distingue, na verdade, pela alta frequência de mutações (Hernandez et al., 1996), sendo que a maioria das mutações é do tipo com perda de sentido, a qual resulta na troca de um aminoácido, alterando a função normal da proteína (Lane, 1992). Essa alteração faz com que a p53 tenha a sua meia-vida aumentada de 20 minutos, na normalidade, até 7 horas nos casos de mutação. Isso aumenta os níveis celulares de p53 que, em condições normais, são baixos (Oram et al., 1994; Yokko et al., 2004; Pimentel et al., 2006; Hasson, 2008). Raramente, também pode haver a mutação do tipo sem sentido, na qual há deleção de uma porção do gene ou inserção de nucleotídeos levando a uma parada da leitura do RNA mensageiro, que levará a uma proteína truncada (Blandino et al., 1999).

Atualmente sabe-se que um dos principais danos causados pela radiação UV é a alteração genética do gene *TP53*, provocando anomalias na proteína p53, por ele codificada. Em situações normais, a produção de proteína p53 não é recrutada, contudo em situações de estresse, como incidência de radiação ionizante, hipoxia, ativação de oncogenes que causam danos ao DNA, entre outras, ela é recrutada, levando a uma regulação do ciclo celular e da apoptose e a uma reparação do DNA (Colman et al., 2000). Desta maneira, a alteração da p53 a torna incapaz de reparar defeitos no DNA, permitindo a divisão celular sem correções e tendo como consequência o acúmulo de mutações.

A radiação UV provoca dois tipos de mutação no DNA: a troca de uma citosina por uma timina (mutação C→T) ou, menos frequentemente, a troca dupla das bases (CC→TT). Esse tipo de alteração é considerada a mutação-assinatura da radiação UV (Kuerbitz et al., 1992).

Mutações no *TP53* são encontradas em metade dos cânceres humanos e estão presentes em 90% dos carcinomas *in situ* (Ortonne, 2002). Análises de carcinomas de pele, tanto em humanos quanto em cobaias, demonstram que mutações em *TP53* são responsáveis pelo desenvolvimento desse tipo de lesão (Benjamin et al., 2008). No *TP53* as mutações típicas da radiação UV são mais comumente encontradas nos exons de 5 a 8 (Jonason et al., 1996) e têm sido encontradas em 90% dos carcinomas epidermóides de pele e em 50% dos carcinomas basocelulares (Ortonne, 2002). Mutações do *TP53* também têm sido observadas em alta frequência em carcinomas de pele de pacientes com xerodermia pigmentosa, sendo que a maioria dessas é do tipo duplo CC→TT (Dumaz et al., 1993; Sato et al., 1993).

Em lesões cancerizáveis de pele também se observa uma alta frequência de mutação do *TP53*, o que indicaria um estágio genético precoce da fotocarcinogênese (Nakazawa et al., 1994; Jonason et al., 1996; Ren et al., 1996). Estudos com queratose actínica feitos por Ziegler *et al.* (1996) observaram a presença da mutação C→T em 66% dos casos. Em queilite actínica a expressão de p53 mostrou-se importante em estágios precoce da carcinogênese (Martinez et al., 2005). Já Nelson et al (1994) observaram esta mesma mutação em 53% de seus casos. Todavia, outros estudos revelam também a presença de p53 em lábio normal e também nas margens livres de carcinomas de lábio, sendo sugerido que esta expressão estava relacionada à exposição deste lábio como um todo à radiação UV, o que poderia levar a um aumento da expressão de p53 mesmo na parte normal do lábio (Brennan et al., 1995; Martinez et al., 2005), além de estudos que observaram a presença de p53 em todas as queilites actínicas ou lesões cancerizáveis de pele estudadas e que não conseguiram também relacionar os graus de displasia epitelial com qualquer aumento na probabilidade de

malignização da lesão, considerando que para a queilite actínica a p53 não seria um marcador de malignização (Crosthwaite et al., 1996; Pimentel et al., 2006; Freitas et al., 2008). Isso poderia demonstrar que a fotocarcinogênese possui um mecanismo independente que a diferencia da carcinogênese provocada por outros fatores etiológicos (Levine et al., 1994).

Vale lembrar que os mecanismos da p53 são vias que interagem com centenas de outros genes e proteínas, que podem se regular mutuamente. Independente de um possível mecanismo diferenciado da p53 na fotocarcinogênese, a principal função dela continua sendo a de auxiliar no reparo do DNA. Entretanto, nem sempre essa função consegue ser totalmente eficiente a ponto de garantir a integridade do DNA, e, quando isso ocorre, inicia-se a participação da p53 na apoptose (Albrechtsen et al., 1999; Sionov; Haupt, 1999; Shen; White, 2001).

Quando a apoptose é dependente da função de transativação da p53, esta faz uma ativação transcripcional de genes que podem contribuir, ou até mesmo serem essenciais, no mecanismo de apoptose. Alguns dos genes-alvos da p53 podem ser incapazes de induzir a apoptose sozinhos, necessitando de uma ação conjunta com outros genes que ativarão vias paralelas de apoptose. Entre as vias paralelas que podem ser ativadas quando necessário estão a via do *IGFBP3*, a via do *KILLER/DR5* e a via do *Fas/FasL* (Sionov; Haupt, 1999; Shen; White, 2001).

O gene *FAS* (Apo1/CD95) — que é um dos genes alvo da p53 — codifica uma proteína de mesmo nome, que é um receptor transmembrana, membro da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumor necrosis factor*) (Peter et al., 1998). Esse receptor possui uma porção citoplasmática, que unida ao FADD (do

inglês *Fas-associated death domain*) e à procaspase 8, forma o DISC (do inglês *death-inducing signalling complex*) (Chinnaiyan et al., 1995). Quando o receptor Fas se liga ao seu ligante específico — o FasL —, ocorre uma trimerização desse receptor, mudança que provoca o recrutamento do FADD e da procaspase 8, que como consequência irão formar e ativar o DISC (Chinnaiyan et al., 1995; Yang et al., 1997). A atividade proteolítica do DISC pode ativar a cadeia apoptótica das caspases resultando na degradação celular (Muzio et al., 1997).

Estudos mais recentes vêm propondo o papel direto da radiação UV na indução da apoptose através da via Fas/FasL (Oishi et al., 1994). Em um modelo experimental no qual queratinócitos em cultura de células foram irradiados com radiação UV, mostrou-se uma ativação direta do receptor Fas induzindo a apoptose sem a necessidade de sua ligante, o FasL. A radiação UV produziu um fenótipo Fas negativo Fas-L positivo, enquanto queratinócitos normais têm fenótipo Fas positivo (Oishi et al., 1994). A perda da expressão do Fas/Fas-L mediando a apoptose em queratinócitos mutados pode contribuir para a fotocarcinogênese (Aragane et al., 1998).

Estudo realizado por Filipowicz et al (2002) analisou a expressão imuno-histoquímica de Fas em amostras de pele normal sem exposição solar, amostras de pele com exposição solar crônica (com elastose solar, porém sem nenhum sinal de displasia), queratose actínica, carcinoma epidermoide de pele, carcinoma basocelular e queratoacantoma. Seus resultados demonstraram que nas amostras de pele normal sem exposição solar houve expressão de Fas restrita à camada basal do epitélio; já nas amostras de pele com exposição solar crônica houve um aumento da expressão, e o Fas passou a ser expresso em outras camadas do epitélio. Observou-se também uma

alta expressão de Fas nos queratoacantomas, principalmente nos locais em contato com um infiltrado inflamatório linfocitário. Já nos casos de carcinoma epidermoide e de carcinoma basocelular não houve expressão de Fas. Esses resultados levaram os autores a sugerirem o importante papel de Fas no progresso da fotocarcinogênese.

Outros estudos, ainda, mostram que a superexpressão de Fas estaria ligada a um prognóstico pobre em diversos tipos de carcinomas, isso porque células normais tendem a tirar seu suprimento de Fas da própria dieta do indivíduo, mas as células malignas sintetizam seu próprio Fas, fazendo com que seus níveis sejam de 4 a 20 vezes maiores do que em células normais (Guo et al., 2000; Menendez; Lupu; 2007; Silva et al., 2007). Estudos em cobaias também mostram que a baixa expressão de Fas está associada à menor incidência de cânceres e também à tumores de menor tamanho (Gilbert et al., 2008). Entretanto, outros estudos mostram que a baixa expressão de Fas unida a uma alta expressão de FasL facilitaria o processo de invasão do tecido adjacente. Wang et al (2010) demonstraram uma maior expressão de FasL em carcinoma epidermoide de pele em relação ao carcinoma basocelular, sugerindo que essa característica estaria relacionada com a maior habilidade em provocar metástase deste primeiro.

Já no lupus eritematoso, que é uma doença autoimune benigna de pele, mais frequentemente envolvida em áreas com exposição solar, o Fas foi observado em queratinócitos e no infiltrado inflamatório no tecido adjacente. O FasL foi observado apenas no infiltrado inflamatório. Segundo os autores, os resultados demonstram que o aumento da expressão do Fas e do FasL é responsável pelos níveis de apoptose no

lupus eritematoso, e que a apoptose está diretamente ligada à patogênese desta lesão (Baima; Sticherling, 2001).

A apoptose, como dito anteriormente, é um mecanismo de extrema importância na homeostase do indivíduo. E dentre os genes-alvo da p53, e que também possui um mecanismo paralelo para apoptose, está o gene *BAX* que promove a morte celular facilitando a liberação do citocromo c que dispara a cascata de ativação das caspases (Sionov; Haupt 1999; Shen; White, 2001). Em tecidos expostos à radiação UV demonstrou-se que as células tem um padrão de alta expressão tanto de p53 quanto de Bcl2, o que mostraria um quadro bastante favorável à apoptose (Murphy et al 2002; Lee et al., 2003).

Nesta mesma via, mas com uma função antagônica ao *BAX* está o *BCL2* que pertence à família BCL2 que é dividida em dois grupos: os anti-apoptóticos (*BCL2*, *BCL2L1*, *BCL-XL* e *BOO*, entre outros) e os pró-apoptóticos (*BAX*, *BAK*, *BAD*, *BID* e *BOK*, entre outros).

Os genes antiapoptóticos produzem proteínas, dentre elas a Bcl2, que inicialmente são encontradas na membrana da mitocôndria, na membrana do retículo endoplasmático e até mesmo no núcleo (Thomadaki; Scorilas, 2006). O papel dessas proteínas é estabilizar a membrana mitocondrial, prevenir a liberação do citocromo c e, subsequentemente, ligar-se ao Apaf-1 (fator de ativação da apoptose) (Cosulich et al., 1999; Kluck et al., 1997). Ao contrário das proteínas antiapoptóticas, as pró-apoptóticas localizam-se no citosol ou no citoesqueleto. Quando há algum sinal de morte, elas tendem a interagir com as antiapoptóticas, anulando suas funções e ativando assim a maquinaria da apoptose.

O mecanismo de apoptose induzido pela radiação UV é muito complexo e envolve várias vias, assim como as células atingidas por essa radiação apresentam níveis altos de Bax, apresentam também níveis baixos de Bcl2, o que provocaria uma formação de dímeros que provocariam um efeito pró-apoptótico. Isso se comprova com estudos que mostram uma diminuição da expressão de Bcl2 em queilite actínica quando comparada com o lábio normal (Martinez et al., 2005).

BCL2 é um oncogene, identificado pela primeira vez em linfomas B não-Hodking (Tsujiimoto et al., 1984). Promove a carcinogênese prevenindo a morte e aumentando a taxa de divisão celular, contendo a célula na fase G0/G1 do ciclo celular (Guo; Hay, 1999). A expressão de proteínas inibidoras de apoptose é induzida por vários estímulos, como drogas quimioterápicas (Srinivas et al., 1998), queda do fator de crescimento neural ou corticoides (Kobzdej et al., 2000).

O gene *BCL2* produz uma proteína, de mesmo nome, de 26 KDa com um único domínio hidrofóbico em C-terminal, que possibilita a sua localização na parte externa da membrana mitocondrial e, em menor extensão, do envelope do retículo endoplasmático (Thomadaki; Scorilas, 2006). Ela possui, em sua estrutura química, todos os domínios BH, sendo que BH1, BH2, BH3 constituem a parte hidrofóbica por meio da qual ela se liga às proteínas pró-apoptóticas, formando homo ou heterodímeros (Danial, Korsmeyer, 2004; Opferman; Korsmeyer, 2003).

É expressa em uma grande variedade de tecidos fetais, entretanto, em adultos, sua expressão é restrita a células com proliferação e diferenciação mais rápida. Altos níveis de Bcl2 são detectados em células B maduras, em muitos neurônios em desenvolvimento de ratos, em timo, e em poucas células de córtex, de fígado e de linfonodo assim como em jovens células embrionárias de rim (Merry et al., 1994).

Nas glândulas mamárias, é expressa em não grávidas ou em grávidas em período inicial, e perde sua expressão em grávidas em período adiantado de gestação (Schorr et al., 1999).

O *BCL2* pode ser altamente regulado por interleucina 7, ou pela proteína p53 (Slee et al., 2004; Von Freeden-Jeffry et al., 1997). Entretanto, quando este é regulado pela fosforilação do resíduo Ser mediado pela via da MAPkinase ou pela via CPP32, ele perde sua atividade antiapoptótica (Harada et al., 1999).

Tem sido reportado que, em células de mamíferos, a Bcl2 se liga à Apaf-1, sequestrando a caspase 9, o que promoveria o bloqueio do início da cascata proteolítica. Em vários casos, a Bcl2 age prevenindo a ruptura da membrana mitocondrial e a liberação do citocromo c, inibindo mais tarde a associação com a Apaf-1 e, conseqüentemente, a ativação da caspase 9 (Cosulich et al., 1999).

Imuno-histoquimicamente, a Bcl2 tem se mostrado positiva em carcinomas de nasofaringe, de pulmão, de intestino, de próstata, de mama e da cavidade oral (Loro et al., 1999; Ribeiro et al., 2005).

Embora a expressão de Bcl2 seja encontrada em diversos tipos de carcinoma, sabe-se que sua presença também é importante na formação de estruturas de tecidos saudáveis, já que a Bcl2 está expressa, igualmente, tanto no epitélio normal quanto no carcinoma de língua em estágio inicial (Ribeiro et al., 2005). O mesmo acontece na tubulogênese do sistema urinário, em que a sua presença é fundamental para a formação de ductos durante o período embrionário, porém pode ser responsável pela formação de cistos nesse mesmo sistema quando há uma superexpressão durante outras fases (Nagata et al., 1996).

Conclui-se, então, que a radiação UV é um importante fator promotor de dano de DNA causando, como no caso da p53, lesões específicas como a queilite actínica e o carcinoma epidermóide de lábio. Sabendo-se que essa radiação tem atingido em maior quantidade e mais integralmente a superfície terrestre, provocando uma exposição irreversível dos seres humanos, espera-se que haja um aumento destes tipos de lesão tanto benignas quanto malignas. Assim, deve haver uma preocupação em tentar antecipar o diagnóstico, fazendo com que as lesões ainda benignas possam ser detectadas impedindo a instalação da lesão maligna. Neste contexto, estudos que tragam informações de como entender mais profundamente os mecanismos da radiação e seus efeitos nos indivíduos e que promovam a melhora do diagnóstico precoce ou do tratamento são extremamente válidos.

Assim, o estudo de mutação, em um gene importante na carcinogênese como o *TP53* e seus desdobramentos em genes-alvo como *BCL2*, além de vias de apoptose paralelas como a do Fas, são valiosos na tentativa de preencher lacunas no conhecimento desse processo, trazendo mais informações que contribuam com diagnóstico precoce, o tratamento e o prognóstico destas lesões.

3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho teve por objetivo estudar a presença de mutação no gene *TP53* e sua possível mudança no padrão de expressão imuno-histoquímica da proteína por ele codificada, assim como analisar conjuntamente a isso a expressão de outros marcadores que estão relacionadas com o mecanismo de apoptose como a Bcl2 e o Fas. Esses resultados foram utilizados para traçar um padrão da presença ou não de uma progressão da alteração do lábio que levaria desde um vermelhão normal a um carcinoma epidermoide de lábio, passando por todos os graus de displasia, sendo que para a discriminação das displasias foram utilizados dois sistemas classificatórios distintos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, conforme parecer de aprovação número 10/09 (ANEXO A).

4.1 Casuística e análise morfológica

Para este estudo foram selecionados casos de carcinoma epidermoide de lábio e de queilite actínica, todos apresentando degeneração basofílica do colágeno. Foram também selecionados 5 fragmentos de lábio inferior que apresentavam epitélio com aspectos usuais de normalidade, além de ausência de degeneração basofílica do colágeno no tecido conjuntivo, que foram utilizados como padrão de normalidade para a região, e que serão denominados de “epitélio normal” neste texto. Todos os espécimes deste estudo pertencem aos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. O material encontrava-se fixado em formol e embocado em parafina.

Uma avaliação prévia das amostras foi realizada para a seleção dos casos, sendo utilizada para isso a análise morfológica de cortes de 5 µm corados pelo método da hematoxilina e eosina (HE). Obrigatoriamente, na lâmina própria, os casos tanto de queilite actínica quanto de carcinoma epidermoide de lábio deviam apresentar a elastose solar (degeneração basofílica do colágeno).

Após a classificação das displasias, os casos selecionados para este estudo utilizando a classificação da OMS foram 10 casos de queilite actínica com displasias discreta, 10 casos de queilite actínica com displasia moderada e 10 casos de queilite actínica com displasia intensa. Já utilizando a classificação do sistema binário foram 20 casos de queilite actínica de baixo risco e 20 casos de queilite de alto risco. Sendo que todos casos de queilite actínica foram retirados de um universo de 40 casos.

4.2 Classificação das queilites actínicas

Todos os casos de queilite actínica foram avaliados e os graus de displasia epitelial distribuídos em duas classificações distintas. A primeira, de acordo com os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005 (Barnes et al., 2005), dividindo as displasias epiteliais em discreta, moderada e intensa; e uma segunda, feita de acordo com o sistema binário proposto por Kujan et al, 2006, dividindo as displasias em alto e baixo risco.

Quando não havia homogeneidade no corte, a área selecionada para graduação foi aquela com maior número de alterações. A reclassificação foi feita por duas observadoras (AFC e MTM), primeiramente cada observadora executou sua classificação separadamente e em seguidas a reclassificação foi feita conjuntamente e posterior a isso foram analisados e discutidos os pontos de divergências. Culminado em uma reclassificação única.

Tabela 4.1- Critérios estabelecidos pela OMS para diagnóstico e classificação de displasia epitelial conjuntamente com o sistema binário

DISPLASIA		
Pelo menos um distúrbio arquitetural e um distúrbio celular		
DISCRETA	MODERADA	INTENSA
distúrbios restritos ao terço inferior do epitélio	distúrbios restritos aos dois terços inferiores do epitélio	distúrbios encontrados nos três terços do epitélio
BAIXO RISCO		ALTO RISCO
Até 4 alterações estruturais e 5 alterações celulares		Mais que 4 alterações estruturais e 5 alterações celulares
DISTÚRBIOS		
ARQUITETURAIS		CELULARES
Estratificação epitelial irregular		Anisonucleose
Inversão da polaridade de células basais		Pleomorfismo nuclear
Projeções epiteliais em gota		Anisocitose
Número aumentado de figuras de mitose		Pleomorfismo celular
Mitoses superficiais		Aumento da proporção núcleo-citoplasma
Disqueratose		Mitoses atípicas
Pérolas de queratina		Núcleos hipercromáticos
		Aumento em número/tamanho dos nucléolos

4.3 Imuno-histoquímica

Para a realização das reações imuno-histoquímicas foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina e os cortes submetidos aos anticorpos anti-p53 (DAKO, Carpinteria, CA, EUA), anti-Fas (DBS, Pleasanton, CA, USA) e anti-Bcl2 (DAKO separadamente. Foram preparados, a partir do material emblocado em parafina, cortes de 3 µm, estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas para aumento da

adesividade entre o corte tecidual e a lâmina. Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol e, a seguir, foram reidratados em cadeia descendente de etanóis. Após a reidratação, foi feita a remoção do pigmento formólico através de incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%), por 10 minutos. Após lavagem em água, as lâminas receberam o tratamento de recuperação antigênica, feito com as lâminas totalmente imersas em solução de TRIS 10 mM e EDTA 1 mM, acrescida de 0,05% de Tween 20, pH 8,0, para o anticorpo anti-p53, em solução de ácido cítrico 10 mM, pH 6,0, para o anticorpo anti-Fas e em solução de EDTA 1 mM, pH 9,0, para o anticorpo anti-Bcl2. A recuperação antigênica foi realizada para todos os anticorpos em banho de água aquecido a 95 °C, durante 30 minutos.

Ao final do tratamento de recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados em água destilada, durante 10 minutos, então passaram por água destilada e seguiram para a etapa de eliminação da peroxidase endógena tecidual, realizada pela incubação em dois banhos de 15 minutos cada em solução 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol.

Repetida a lavagem em água, os cortes foram imerso em solução salina de TRIS (Tris base 50 mM, NaCl 150 mM) pH 7,6, fazendo-se três banhos de 5 minutos cada. Todas as etapas na sequência foram precedidas por lavagens em solução tampão de TRIS pH 7,6.

Os anticorpos foram diluídos em solução tampão de TRIS, pH 7,6, acrescida de albumina bovina a 1%, em uma diluição de 1:50, 1:100, 1:50 para os anticorpos anti-p53, anti-Fas e anti- Bcl2 respectivamente, e foram incubados sobre os cortes durante 30 minutos. Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi usado o sistema o kit LSAB+ (DAKO) em incubações de 30 minutos cada.

As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468, DAKO) através de incubação por 10 minutos e, após lavagem em TRIS e água deionizada, para remoção de excessos, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer. Todos os passos desde a utilização dos anticorpos primários até a contracoloração foram realizados automaticamente com o auxílio do Autostainer DAKO (DAKO).

A conclusão do preparo dos cortes foi feita pela desidratação em série crescente de etanóis seguida de diafanização em xilol e montagem em lâmina sintética. A seguir os cortes foram examinados em microscopia de luz.

4.4 Extração de DNA

Todos os casos foram submetidos à extração de DNA. A partir de blocos parafinados foram realizados 20 cortes, de 10 µm de espessura, que foram estendidos em lâminas de vidros e conservados por algumas horas em estufa a 37 °C. Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol e, a seguir, foram reidratados em cadeia descendente de etanóis e em seguida lavados em água destilada. Finalizada esta parte, os cortes foram macrodissecados, com lâmina de bisturi e auxílio de microscópio, e somente a área de interesse de cada lesão foi removida e colocada em tubos de microcentrífuga, nos quais passaram por digestão enzimática com proteinase K 600 mAU/mL (Qiagen Inc., Hilden, Alemanha) em estufa a 55 °C, diluída em tampão fornecido pelo fabricante. A cada 24 horas acrescentou-se 15 µl de proteinase K aos tubos e o material permaneceu neste processo por três dias. A partir desta etapa a

extração do DNA foi feita utilizando-se o QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen Inc.), seguindo-se as especificações do fabricante.

4.5 PCR

O DNA obtido foi amplificado através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando iniciadores específicos para os exons de 5 a 8 do gene *TP53*. As sequências dos iniciadores foram obtidas na literatura e estes produzidos por Prodimol (Minas Gerais, Brasil) (Tabela 4.1).

Para a reação de PCR foram adicionados em tubos de microcentrífuga os seguintes reagentes: 2 µL de DNA, 1 µL de cada um dos iniciadores —senso e antisenso —, 1 µL de dNTP (“deoxynucleoside triphosphate”), 2,5 µL de tampão 10X (Tris-HCl 670 mM, pH 8,5, sulfato de amônio 166 mM, cloreto de magnésio 67 mM, albumina bovina sérica 1,7 mg/mL, β-mercaptoetanol 100 mM, e Triton X-100 a 1%), 0,4 µL de Taq polimerase (Life Technologies, Saithersburg, MD) e água destilada para completar 25 µL.

As condições de ciclagem da PCR foram otimizadas, sendo utilizado um ciclo de desnaturação prévia a 95 °C por 1 minuto, 40 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, associação a 60 °C por 1 minuto para os exons 5 e 8 e extensão a 72 °C por 30 segundos. Um ciclo adicional para extensão final a 72 °C por 7 minutos também foi realizado. O resultado da reação foi avaliado através da eletroforese em gel de agarose 1% com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

Para todas as reações foi utilizado um controle negativo livre de DNA confirmado pelo gel completamente isento de banda.

Tabela 4.2. Iniciadores utilizados e o tamanho de seus produtos em pares de base (pb)

Exon	Iniciador senso (3'→5')	Iniciador Antisenso (5'→3')	Pb
5	TACTCCCCTGCCCTCAACAA	ACCATCGCTATCTGAGCAGC	186
8	GCCTCTTGCTTCTCTTTTCC	TAACTGCACCCTTGGTCTCC	217

4.6 SSCP

Constatada a amplificação das amostras, foi realizado a técnica do polimorfismo de conformação de fita única (SSCP) com a utilização de eletroforese em gel de poliacrilamida em concentração de 8%. O produto de PCR foi misturado a 2 µL de um tampão desnaturante (9 mL de formamida, 1 mL de EDTA 5 mM, 0,025 g de azul de bromofenol e 0,025 g de xilenocianol) e colocado a 95 °C por 15 minutos para desnaturação. Foi utilizado um padrão de pares de base (Fermentas Inc, Canadá) para a determinação do tamanho do fragmento amplificado. A corrida foi feita em tampão de TBE (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) durante 2 horas.

Após o término da corrida, o gel foi fixado com solução de etanol 10% e ácido acético 0,75% durante 20 minutos, em seguida foi realizada a impregnação por prata 0,2% por 20 minutos. A impregnação por prata foi revelada por solução de hidróxido de sódio e formol por 20 minutos. A reação foi finalizada com solução de carbonato de sódio por 5 minutos. Todos os procedimentos foram realizados no escuro sob agitação.

Ao final o gel foi analisado para verificar alterações nos padrões de migração das bandas.

4.7 Análise de resultados

As reações de imuno-histoquímica foram analisadas semiquantitativamente, considerando-se o epitélio como um todo, recebendo cada corte uma graduação. As células foram consideradas positivas ou negativas para o marcador obedecendo uma graduação para a análise da quantidade de células marcadas. Sendo:

- Grau 1: até 5% das células positivas;
- Grau 2: de 5 a 50% das células positivas;
- Grau 3: mais de 50% das células positivas.

A análise estatística dos dados foi realizada através do teste de Kruskal-Wallis e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 MORFOLOGIA

Os casos de queilite actínica eram representados por fragmento de semi-mucosa revestida por epitélio pavimentoso estratificado orto ou paraqueratinizado podendo apresentar atipias variadas. Os carcinomas epidermóides de lábio eram representados fragmentos de neoplasia maligna epitelial que invadia o tecido conjuntivo adjacente. Ambos apresentavam elastose solar.

5.2 p53

Todos os casos estudados, tanto de carcinoma epidermoide de lábio, queilite actínica ou lábio normal apresentaram marcação para a proteína p53. O padrão de marcação foi nuclear em todos os casos. Preferencialmente as marcações para todos os grupos dividiram-se entre as graduações 1 e 2, com poucos casos na graduação 3. Este fato era observado independente da classificação histológica utilizada para as queilites actínicas, sendo que os resultados se repetiram tanto na classificação da OMS quanto no sistema binário.

5.2.1 Carcinoma epidermoide de lábio

Dos 20 casos de carcinoma epidermoide de lábio selecionados para o estudo da expressão da proteína p53, 3 casos apresentaram marcação grau 1, 14 casos obtiveram grau 2 e 3 casos apresentaram grau 3. O padrão de marcação foi basicamente nas células da periferia das ilhotas de invasão e na camada basal do epitélio adjacente à lesão (Figura 5.1D). Apenas 1 caso apresentou marcação em todas as células.

5.2.2 Queilite actínica

5.2.2.1 Classificação da OMS

5.2.2.1.1 Queilite actínica com displasia discreta

Dos 10 casos de queilite actínica com displasia discreta, 5 casos apresentaram marcação grau 1 e 5 casos apresentaram grau 2, sendo que nenhum caso recebeu grau 3.

O padrão de distribuição da proteína p53 na queilite actínica com displasia discreta foi confinada ao terço inferior do epitélio, sendo 7 casos com esse tipo de marcação (Figura 5.1A), 1 caso com marcação restrita a camada basal e 2 casos com negatividade para a proteína.

5.2.2.1.2 Queilite actínica com displasia moderada

Dos 10 casos selecionados de queilite actínica com displasia moderada, para o estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína p53, 3 casos apresentaram grau 1 e 7 casos grau 2. Nenhum caso obteve expressão grau 3.

O padrão de distribuição da proteína p53 na queilite actínica com displasia moderada foi restrita à camada basal em 5 casos e 4 casos tiveram a expressão confinada ao terço inferior do epitélio. O caso restante apresentou células positivas dispersas por todo o fragmento (Figura 5.1B).

5.2.2.1.3 Queilite actínica com displasia intensa

Dos 10 casos selecionados de queilite actínica com displasia intensa para o estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína p53, 4 casos apresentaram grau 1 de positividade, 4 casos apresentaram grau 2 e 2 casos grau 3.

O padrão de distribuição das células positivas foi bastante heterogêneo neste grupo. Entre os casos estudados, 3 apresentaram células marcadas em todas as camadas, 2 casos apresentaram marcação em dois terços do epitélio, 3 casos mostram predominância de marcação na camada basal e 2 casos foram isentos de células positivas. (Figura 5.1C).

5.2.2.2 Classificação pelo sistema binário

5.2.2.2.1 Queilite actínica de baixo risco

Dos 20 casos selecionados de queilite actínica de baixo risco para o estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína p53, 9 casos apresentaram marcação grau 1, 10 casos grau 2 e 1 caso recebeu grau 3.

O padrão de distribuição das células positivas para a proteína p53 na queilite actínica de baixo grau foi heterogêneo. Houve casos com apenas raras células positivas, outros com células positivas por todas as camadas do epitélio, e ainda 2 casos totalmente negativos para o marcador. Porém, o padrão que se repetiu com maior frequência (9/20 casos) foi o que apresentava marcação restrita à camada basal.

5.2.2.2.2 Queilite actínica de alto risco

Dos 20 casos selecionados de queilite actínica de baixo risco para o estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína p53, 7 casos apresentaram marcação grau 1, 10 casos apresentaram marcação grau 2 e 3 casos grau 3.

O padrão de distribuição das células positivas para a proteína p53 na queilite actínica de alto grau também se apresentou heterogêneo, sendo que a principal característica deste padrão foi o maior número de células positivas, tendo 4 casos apresentado marcação de um terço do epitélio 4 casos com marcação de dois terços do epitélio e 3 casos com marcação de todas as camadas Dois casos foram totalmente negativos para o marcador.

5.2.3 Epitélio normal

Todos os 5 casos de lábio normal estudados foram graduados 1 para expressão da proteína p53 e, caracteristicamente, apenas raras células da camada basal se apresentavam com marcação.

A Tabela 5.1 apresenta as porcentagens de células positivas para a proteína p53 nos diferentes grupos estudados.

Tabela 5.1- p53- porcentagem de casos distribuídos por grau de marcação nas classificações da OMS e no sistema binário

Classificação			1	2	3
Carcinoma de epidermoide de lábio			15%	70%	15%
Queilite actínica	OMS	Discreta	50%	40%	10%
		Moderada	30%	70%	0%
		Intensa	40%	40%	20%
	SB	Baixo	45%	50%	5%
		Alto	35%	50%	15%
Epitélio normal			100%	0%	0%

5.2.8 Análise estatística da expressão da proteína p53

Todos os grupos foram comparados entre si através de teste não-paramétrico de Kruskal – Wallis, no qual $p < 0,05$. Embora existisse um grupo controle de 5 casos de

lábio normal, para o tratamento estatístico, esse grupo não foi utilizado devido ao baixo número de casos, o que levaria a uma distorção estatística.

Quando comparados os grupos de carcinoma epidermoide de lábio, queilite actínica com displasia discreta, queilite actínica com displasia moderada, queilite actínica com displasia intensa ou queilite actínica de baixo risco e queilite actínica de alto risco para a expressão da proteína p53, observou-se não haver diferença estatisticamente significativa em nenhuma das comparações. Ou seja, para todos os casos $p > 0,05$.

Figura 5.1- marcação imuno-histoquímica para a proteína p53. A- carcinoma epidermóide de lábio; B- queilite actínica com displasia epitelial discreta; C- queilite actínica com displasia epitelial moderada; D- queilite actínica com displasia epitelial intensa (40X)

5.3 Bcl2

No estudo da proteína Bcl2 observou-se expressão apenas citoplasmática sem variação de intensidade. Além disso, um grande número de casos (26/60) foram negativos para esta proteína e não houve caso graduado como 3, ou seja, não houve nenhuma marcação que apresentasse mais de 50% das células positivas. É importante salientar ainda, que os controles internos positivos para a marcação de Bcl2 (células inflamatórias) sempre que presentes, apresentavam marcação.

5.3.1 Carcinoma epidermoide de lábio

Dos 20 casos de carcinoma epidermoide de lábio selecionados para este estudo, 17 casos apresentaram marcação grau 1 e 3 casos grau 2. Sendo que 12 casos, dos 17 que obtiveram grau 1, apresentaram-se negativos para a presença desta proteína. O padrão de marcação foi basicamente nas células da camada basal do epitélio adjacente à lesão (Figura 5.2D).

5.3.2 Queilite actínica

5.3.2.1 Classificação da OMS

5.3.2.1.1 *Queilite actínica com displasia discreta*

O padrão de distribuição da marcação para a proteína Bcl2 na queilite actínica com displasia discreta foi confinada à camada basal do epitélio, sendo 7 casos com esse tipo de marcação (Figura 5.2A), 1 caso com marcação de eventuais células espalhadas por todo o epitélio, 1 caso com células marcadas nas camadas basal e parabasal e 2 casos com marcação negativa.

5.3.2.1.2 Queilite actínica com displasia moderada

Dos 10 casos selecionados de queilite actínica com displasia moderada para o estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína Bcl2, 5 casos apresentaram grau 1 e 5 casos grau 2.

O padrão de distribuição foi positividade restrita à camada basal em 5 casos, 1 caso com marcação confinada ao terço inferior do epitélio, 1 caso com raras células marcadas e 3 casos com ausência de marcação (Figura 5.2B).

5.3.2.1.3 Queilite actínica com displasia intensa

Dos 10 casos selecionados de queilite actínica com displasia intensa para o estudo da expressão da proteína Bcl2, 100% obtiveram marcação grau 1. O padrão de marcação desta proteína na queilite actínica com displasia intensa foi também exclusivamente citoplasmática. Sendo que 4 casos obtiveram raras células marcadas com distribuição predominante nas camadas inferiores do epitélio e 6 casos sem apresentar qualquer marcação (Figura 5.2C).

5.3.3.1 Classificação pelo sistema binário

5.3.3.1.2 *Queilite actínica de baixo risco*

Dos 20 casos selecionados de queilite actínica de baixo risco para o estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína Bcl2, 10 casos foram graduados como 1 e 10 casos como grau 2. O padrão tecidual da marcação foi o mesmo citado anteriormente, sendo 13 casos com marcação distribuída predominantemente na camada basal, 3 casos com raras células marcadas nas camadas mais inferiores do epitélio, 1 caso com marcação no terço inferior do epitélio e 3 casos negativos.

5.3.3.1.3 *Queilite actínica de alto risco*

Dos 20 casos selecionados de queilite actínica de alto risco para o estudo da proteína Bcl2, 18 casos apresentaram marcação grau 1 e 2 casos marcação grau 2. Sendo 3 casos com marcação na camada basal, 6 casos com raras células marcadas e 11 casos com ausência de marcação.

Tabela 5.2- Bcl2- porcentagem de casos distribuídos por grau de marcação nas classificações da OMS e do sistema binário

Classificação			1	2	3
Carcinoma de epidermoide de lábio			85%	15%	0%
Queilite actínica	OMS	Discreta	50%	50%	0%
		Moderada	50%	50%	0%
		Intensa	100%	0%	0%
	SB	Baixo	50%	50%	0%
		Alto	90%	10%	0%
Epitélio normal			100%	0%	0%

5.3.4 Epitélio normal

Para os 5 casos de lábio normal estudados para a proteína Bcl2, todos foram graduados com 1, sendo que 4 casos apresentaram marcação em somente a camada basal e 1 caso apresentou marcação em raras células.

5.3.5 Análise estatística da expressão da proteína Bcl2

Todos os grupos foram comparados entre si através de teste não-paramétrico de Kruskal – Wallis, adotando-se $p < 0,05$ para significância estatística, sendo que os casos de lábio normal foram retirados do tratamento estatístico.

Quando comparados os grupos cuja classificação utilizada foi a preconizada pela OMS, observou-se não haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Porém quando comparados os grupos queilite actínica com displasia intensa x queilite actínica com displasia moderada e queilite actínica com displasia intensa x queilite

actínica com displasia discreta observou-se a presença de uma situação limite nas quais ambas as comparações apresentavam o valor de $p=0,05$.

Gráfico 5.1- Análise estatística de comparação entre os grupos na classificação da OMS

Já quando a classificação utilizada foi a do sistema binário, observou-se uma diferença estatisticamente significante entre os grupos carcinoma epidermoide de lábio x queilite actínica de baixo risco e queilite actínica de baixo risco x queilite actínica de alto risco.

Gráfico 5.2- Análise estatística de comparação entre os grupos na classificação do sistema binário

Figura 5.2- marcação imuno-histoquímica: A- Carcinoma epidermóide de lábio; B- queilite actínica com displasia epitelial discreta; C- queilite actínica com displasia epitelial moderada; D- queilite actínica com displasia epitelial intensa (40x).;

5.4 Fas

Para todos os casos estudados o padrão de marcação para a proteína Fas foi citoplasmático. As marcações para todos os grupos se dividiram entre as 3 graduações possíveis.

5.4.1 Carcinoma epidermoide de lábio

Dos 20 casos de carcinoma epidermoide de lábio selecionados para o estudo da expressão da proteína Fas, 10 casos apresentaram marcação grau 1, 6 casos obtiveram grau 2 e 4 casos grau 3. Sendo que apenas 1 caso se mostrou negativo para a marcação imuno-histoquímica de Fas.

O padrão de marcação foi sempre em áreas que apresentavam queratina ou paraqueratina, como na camada córnea ou nas pérolas de queratina (Figura 5.3D).

5.4.2 Queilite actínica

5.4.2.1 Classificação da OMS

5.4.2.1.1 Queilite actínica com displasia discreta

Dos 10 casos de queilite actínica com displasia discreta, 9 casos apresentaram marcação grau 1, nenhum caso apresentou marcação grau 2 e 1 caso apresentou grau 3. Sendo que 3 casos sem marcação.

O padrão de distribuição da proteína Fas na queilite actínica com displasia discreta foi preferencialmente na camada córnea, sendo 5 casos com marcação nesta localização, 1 caso de marcação na camada basal, 1 caso com marcação nos dois terços superiores do epitélio (Figura 5.3A).

5.4.2.1.2 Queilite actínica com displasia moderada

Dos 10 casos selecionados de queilite actínica com displasia moderada para o estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína Fas, 9 casos receberam grau 1, 1 caso recebeu grau 2 e nenhum caso obteve grau 3.

Em 6 casos a positividade foi exclusivamente na camada córnea, 1 caso demonstrou positividade no terço inferior do epitélio e na camada córnea e 3 casos foram negativos para o marcador (Figura 5.3B).

5.4.2.1.3 Queilite actínica com displasia intensa

Dos 10 casos selecionados de queilite actínica com displasia intensa para o estudo da expressão da proteína Fas, todos foram graduados como 1.

O padrão de marcação foi o mesmo dos grupos anteriores, sendo que 6 casos apresentaram positividade apenas na camada córnea, 1 caso teve raras células esparsas positivas e 3 casos não obtiveram marcação imuno-histoquímica para a proteína Fas.

5.4.3.1 Classificação pelo sistema binário

5.4.3.1.1 *Queilite actínica de baixo risco*

Dos 20 casos seleccionados de queilite actínica de baixo risco para o estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína Fas, 19 casos foram graduados como grau 1, nenhum caso recebeu grau 2 e apenas 1 caso recebeu grau 3. Sendo que 12 casos apresentaram marcação na camada córnea, 1 caso demonstrou expressão da proteína nos dois terços superiores do epitélio, 1 caso foi positivo apenas na camada basal e 6 casos foram negativos para a proteína Fas.

5.4.3.1.2 *Queilite actínica de alto risco*

Dos 20 casos seleccionados de queilite actínica de alto risco para o estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína Fas, 18 casos apresentaram marcação grau 1, 1 caso apresentou grau 2 e 1 caso grau 3.

Quanto à distribuição, 10 casos apresentaram positividade apenas na camada córnea, 1 caso teve todo o seu epitélio positivo, 1 caso apresentou apenas o terço inferior e a camada córnea com marcação, 1 caso com raras células marcadas dispersas pelo epitélio, 1 caso com marcação na pérola de queratina e 6 casos negativos para a marcação.

5.4.4 Epitélio normal

Dos 5 casos de lábio normal estudados para esta proteína, todos obtiveram marcação grau 3, sendo que todas as camadas do epitélio mostraram-se positivas e 1 caso mostrou positividade de alguns núcleos além do padrão citoplasmático da proteína.

Tabela 5.3- Fas- porcentagem de casos distribuídos por grau de marcação nas classificações da OMS e do sistema binário

Classificação			1	2	3
Carcinoma de epidermoide de lábio			50%	30%	20%
Queilite actínica	OMS	Discreta	90%	0%	10%
		Moderada	90%	10%	0%
		Intensa	100%	0%	0%
	SB	Baixo	95%	0%	5%
		Alto	90%	5%	5%
Epitélio normal			0%	0%	100%

5.4.5 Análise estatística da expressão da proteína Fas

Assim como os grupos anteriores para a proteína Fas, todos os grupos foram comparados entre si através de teste não-paramétrico de Kruskal – Wallis para o qual foi adotado $p < 0,05$ para significância estatística. Os casos de epitélio normal do vermelhão do lábio foram retirados do tratamento estatístico.

Quando comparados os grupos no sistema binário não se observou nenhuma diferença estatisticamente significativa, sendo todos os valores de $p > 0,05$.

Quando o sistema de classificação utilizado foi o da OMS, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos carcinoma epidermoide de lábio X queilite actínica com displasia intensa.

Entretanto, observou-se uma situação limite quando comparados os grupos carcinoma epidermoide de lábio x queilite actínica com displasia moderada e carcinoma epidermoide de lábio x queilite actínica com displasia discreta, sendo os valores de $p = 0,05$.

Gráfico 5.3- Análise estatística de comparação entre os grupos na classificação da OMS

5.5- SSCP

Para ambos os exons estudados, 5 e 8, não se observou alteração no padrão de migração das bandas no gel de poliacrilamida 12%, sendo iguais em todos os grupos: carcinoma epidermoide de lábio, queilite actínica em todas todos os graus de displasia e epitélio normal do vermelhão do lábio.

Para o exon 5 obteve-se a amplificação e a presença de bandas em 18 amostras de carcinoma epidermoide de lábio e todas as amostras de queilite actínica.

Já para o exon 8 obteve-se a amplificação e a presença de bandas em 18 amostras de carcinoma epidermoide de lábio, 6 amostras de queilite actínica com displasia discreta, 5 amostras de queilite actínica com displasia moderada, 7 amostras de queilite actínica com displasia intensa e 4 casos de epitélio normal do vermelhão do lábio.

6 DISCUSSÃO

Os atuais níveis de radiação UV que atingem a superfície terrestre estão cada vez mais altos, o que conseqüentemente leva a um aumento na incidência de lesões que possuem este fator etiológico (Wang et al., 2010). Por não ser um fator discriminador e atingir qualquer indivíduo com quase a mesma intensidade e probabilidade, isso o torna um alvo de estudos cada vez mais importante, já que é necessário que haja uma melhora do diagnóstico, do tratamento e do prognóstico dessas lesões.

Para isso, estudos de marcadores biológicos que ajudem no entendimento do processo biológico de formação e progressão dessas lesões, juntamente com recursos de biologia molecular, têm contribuído para o esclarecimento de alguns pontos obscuros.

A radiação UV, como dito anteriormente, é causadora de lesões e, ao contrário de diversos outros fatores etiológicos, mostra alterações genéticas típicas no tecido exposto, como a mutação C→T do gene *TP53*, por exemplo (Jonason et al., 1996). Essa característica faz com que os estudos possam ser mais focados e um pouco mais objetivos. As alterações, tanto do gene quanto da proteína p53, nas mais diversas patologias, vêm sendo vastamente estudadas há pelo menos 30 anos (Levine; Orem, 2009). Isso se deve principalmente à função deste gene — que é o chamado “guardião do genoma” — de reparar os danos causados ao DNA, sendo considerado por alguns autores como o mais importante supressor de tumor (Vousden; Prives, 2009).

Todavia, sabe-se que no processo de carcinogênese não somente as alterações não reparadas do DNA são responsáveis pelo aparecimento de uma patologia. Outro fator de extrema importância nesse processo são os mecanismos de apoptose, que estão entre os principais fatores de homeostase do tecido. A apoptose poderia ser chamada como um segundo fator de “controle interno”. Ou seja, quando o sistema de reparo de DNA — por exemplo, o executado pela p53 — falha, tem-se um outro posto de controle que impede com que uma célula com dano progrida. Inúmeras vias apoptóticas podem ser ativadas e levando à morte celular, impedindo a propagação de mutações não desejáveis ao organismo. Quando há resistência celular a este mecanismo esta célula alcança a imortalidade (Wang et al., 2010).

O mecanismo responsável pela apoptose possui basicamente duas vias: uma intrínseca, ou também conhecida como mitocondrial, e uma extrínseca (Rolland; Conradt, 2010). Na via intrínseca competem entre si tanto os fatores pró-apoptóticos quanto os fatores antiapoptóticos. Dentre os fatores antiapoptóticos está o gene *BCL2*, que codifica a proteína Bcl2 e que é regulado pela p53. Já na via extrínseca, o complexo Fas/FasL é um dos principais na ativação da apoptose (Strasser et al., 2009).

A importância desses dois sistemas faz com tanto *TP53*, quanto genes e proteínas relacionados com a apoptose, sejam alvo de estudos nos mais diversos tipos de lesões, das mais variadas origens (Hussain et al., 2001; Schneider-Stock et al., 2004; Wu et al., 2004; Chen et al., 2010), desde lesões cancerizáveis até neoplasias malignas, ou mesmo outras lesões benignas. Normalmente, nesses casos, o intuito é se projetar uma possível progressão das lesões. Isso seria útil já que tem crescido a importância do diagnóstico precoce e da melhora do prognóstico. Logo, a detecção da presença de p53 ou de possíveis alterações que nela ocorram, podem ser sinais de

modificações que poderão apresentar reflexos relevantes no surgimento de patologias, ou permitirem ainda um processo de malignização em determinadas situações (Pimentel et al., 2006; Queille et al., 2007).

Dentre essas situações que podem passar por um processo de malignização está a queilite actínica, que é considerado um estágio precedente ao aparecimento do carcinoma epidermoide de lábio (Pimentel et al., 2006; Martinez et al., 2008; Ulrich et al., 2010). Embora se estime que nem todas as queilites actínicas se transformem em carcinoma epidermoide de lábio, a taxa de transformação é estimada entre 10 a 20%. Sabe-se que a taxa de carcinoma epidermoide de lábio que foram precedidos por queilites actínicas é grande, aproximadamente 97% (Salasche, 2000). Por isso, há uma larga discussão sobre o caminho percorrido pela queilite actínica, o qual a possibilitaria chegar a um carcinoma epidermoide de lábio. Já que, como dito anteriormente, sabe-se que quase a totalidade dos carcinomas epidermóides de lábio foram precedidos por uma queilite actínica, a dúvida pertinente seria quais as alterações deste tecido que existiriam nestes 10 a 20% que determinariam a evolução para um quadro maligno.

Neste sentido, o estudo de diversos marcadores prognósticos que prediriam as alterações (Brennan et al., 1995; Crosthwaite et al., 1996; Agarwal et al., 1999; Benjamin et al., 2008; Freitas et al., 2008; Martinez et al., 2008), bem como a graduação histológicas dessas lesões, seriam meios para sanar essa dúvida (Kujan et al., 2007; Warnakulasuriya et al., 2008).

Este trabalho reflete a preocupação com a relevância das classificações e da real existência de uma progressão malignas por etapas. Ou seja, a malignização de uma lesão realmente percorreria todas as etapas de displasia epitelial até se transformar em um carcinoma, como já anteriormente foi sugerido em casos de lesões

cancerizáveis intraorais (Agarwal et al., 1999) e também em outros sistemas como cólon de útero e intestino?

Estudos com p53, como o de Pimentel et al (2006) mostram que essa progressão não ocorre, ou que pelo menos o gene e/ou a proteína p53 não seriam bons sinalizadores para esta função. Nossos resultados corroboram com isso, pois mesmo tendo se utilizado duas classificações distintas para as displasias, observou-se não haver diferença estatística da expressão dessa proteína, acontecendo o mesmo com a proteína Bcl2.

Quando analisado o gene *TP53* também não se pode notar a presença de nenhuma alteração no padrão de migração de bandas, tanto no exon 5 quanto no exon 8. Mostrando que as mutações desse gene podem ser pontuais, e que a maior parte de seu código se apresenta íntegro

A expressão de p53 mostrou-se predominantemente até metade do epitélio, independente do grau de displasia apresentada. Quando analisado o carcinoma, a expressão quase sempre ocorria na periferia das ilhotas, não havendo uma expressão exacerbada. Isso provavelmente explicaria o comportamento mais indolente do carcinoma epidermoide de lábio assim com os achados em relação aos níveis de Bcl2, que foram bastante baixos ou mesmo, muitas vezes, negativos. Esses mesmos achados estão presentes em outros estudos, que mostram uma moderada expressão de p53 com uma baixa expressão de Bcl2 (Garcia-Montesinos-Perea et al., 2005; Martinez et al., 2005).

Como dito anteriormente, o equilíbrio entre proliferação e morte celular é sempre o objetivo a ser alcançado pelo organismo, sendo por este motivo os dois principais fatores analisados na carcinogênese, já que as alterações celulares modificam tanto a

capacidade de proliferação da célula como a sua habilidade em programar a sua morte. Esse equilíbrio vem sendo vastamente estudado, inclusive relacionado com a exposição à radiação UV (Murphy et al., 2002; Yanamoto et al., 2002; Feinmesser et al., 2003; Martinez et al., 2005; Martinez et al., 2008).

No desenvolvimento da carcinogênese espera-se que esses mecanismos estejam alterados e, quanto maior a agressividade da lesão, mais alteração poderíamos observar. O fato de o carcinoma epidermoide de lábio ter apresentado uma baixa expressão de p53, ao contrário de diversas outras lesões malignas, conjuntamente com uma também baixa expressão de Bcl2 e uma exacerbada expressão de Fas, sugere que, embora haja alteração em p53, sendo a versão mutada a que é prevalentemente detectável pela imuno-histoquímica, os mecanismos de apoptose parecem estar preservados, uma vez que o fator antiapoptótico que impediria a morte celular e ajudaria a promover a proliferação e o crescimento deste tumor se apresenta em níveis baixos e o fator pró-apoptótico se apresenta contrariamente em níveis altos.

A mesma conclusão que os mecanismos de apoptose estão preservados na queilite actínica foram observados em outros estudos (Martinez et al., 2005, 2008). O fato de Fas manter sua expressão elevada no carcinoma epidermoide de lábio mostra que sua via de apoptose está funcionando normalmente, como relatado em diversos outros tipos de carcinoma (Silva et al., 2007; Silva et al., 2008; Krontiras et al., 1999). Essa alta expressão de Fas também está relacionada com a melhor diferenciação da neoplasia e, ainda, com a baixa frequência de recidiva, como acontece no carcinoma epidermoide de lábio, que normalmente é bem diferenciado e com pouca recorrência (Pinto et al., 2010), enquanto Fas ser pouco expresso nas queilites actínicas pode se dever ao fato dessa lesão ser um processo menos proliferativo e por isso mesmo não

necessitar de um controle apoptótico mais rígido. Assim, pode-se imaginar que, embora haja alterações gênicas, essas estão conseguindo ser controladas pelos mecanismos apoptóticos, que fariam com que a lesão obtivesse o crescimento mais restrito e também dificultaria a possibilidade de metástase.

A compilação de resultados aqui apresentados demonstrou não haver alteração do gene *TP53* nos exons estudados em nenhuma das situações apresentadas, ocorrendo o mesmo em relação à expressão imuno-histoquímica, tanto de p53 quanto de Bcl2 que não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos estudados quando utilizada a classificação da OMS, além de demonstrar que a expressão de Fas sugeriria um funcionamento normal de suas vias em todos os grupos. Unindo-se isso às reflexões anteriormente discutidas, pode-se sugerir que toda a discussão em torno de como deveriam ser as classificações, e qual a melhor classificação, parece perder um pouco o sentido, isso porque a principal função de uma classificação seria inserir a lesão em um determinado grupo segundo sua propensão a um pior prognóstico.

Essa preocupação estaria diretamente relacionada com o tipo de tratamento que seria realizado pelo clínico após o diagnóstico emitido pelo patologista. Porém, quando se observa que através do estudo genético ou de expressão de determinadas proteínas — entre eles um consagradamente importante na carcinogênese, como *TP53* e sua proteína —, não observamos diferenças, exceto as morfológicas, que tecnicamente inseririam essas lesões em grupos diferentes, podemos colocar em questão a necessidade e a validade destas classificações.

Afinal, se uma queilite actínica com displasia discreta apresentou o mesmo padrão gênico e proteico de uma com displasia intensa, não haveria motivos para se pensar que uma teria mais possibilidades de malignização do que a outra. Neste

sentido, em que ambas poderiam passar diretamente para o carcinoma epidermoide de lábio, aventaria-se a possibilidade de que a queilite actínica com displasia intensa e com as alterações morfológicas mais importantes, represente, na verdade, um processo mais antigo, que teve mais tempo para acumular essas alterações morfológicas. Sendo assim, poderia se pensar que a queilite actínica com displasia morfológica mais baixa poderia ser uma lesão mais agressiva, já que chegaria mais rapidamente à formação da lesão maligna.

Os nossos resultados corroborariam com esse pensamento, principalmente quando analisamos as classificações utilizadas e observamos que quando a classificação possuía um menor número de divisões, apresentou um melhor resultado de diferenciação entre os grupos, como foi o caso de Bcl2, que ao se usar os critérios da OMS nenhuma comparação apresentou $p < 0,05$. Contudo, quando usados os critérios do sistema binário, duas comparações (carcinoma epidermoide de lábio x queilite actínica de baixo risco e queilite actínica de baixo risco x queilite actínica de alto risco) apresentaram $p < 0,05$.

Assim, talvez, o mais importante de toda esta análise é que a queilite actínica deva ser vista como um quadro único, independente do grau morfológico de displasia apresentado, ou seja, como Cockerrell (2000) definiu, como sendo uma lesão em lábio que precede o aparecimento do carcinoma epidermoide. Sem em momento algum citar que a presença de algumas alterações aumentaria ou diminuiria a validade dessa afirmação.

Portanto, sugere-se que, até que mais estudos comprovem ou refutem esta teoria, a queilite actínica seja tratada igualmente em todas as situações. O acompanhamento deve ser o mesmo, pois pudemos perceber que não é possível

considerar a queilite actínica com displasia discreta como um quadro muito mais inocente e que devesse ter uma preservação mais espaçada. Afinal, essa é a conduta passada ao clínico quando o patologista gradua de maneira diferente as lesões, dividindo-as em graus de displasia distintos e inconscientemente transmitindo valores de preocupação e cuidado também diferentes a cada um deles.

Isso, inevitavelmente irá repercutir no paciente, uma vez que a mesma situação encontrada entre o patologista e o clínico será encontrada entre o clínico e o paciente, levando com que, frente a um diagnóstico de displasia discreta, o clínico tenha uma conduta menos incisiva, e que o paciente acabe por ter uma preocupação menor em relação à lesão e também aos cuidados em torno dela. Desde o uso de barreiras que impeçam ainda mais a penetração da radiação UV como também nos retornos periódicos ao clínico.

Em sendo necessário o uso de uma classificação, suger-se-ia a adoção de um sistema mais simplificado, como o binário, que neste trabalho se mostrou mais eficaz. Contudo, mais adequado seria encarar a queilite actínica da forma mais simples, e que talvez tanto para o clínico quanto para o paciente a mais segura, como uma lesão única e que deve inspirar os mesmos cuidados sempre. Isso sem maneira alguma incentivar o uso de práticas invasivas desnecessárias como meio de tratamento destas lesões.

Porém, vale ressaltar que, embora neste caso a classificação do sistema binário tenha se mostrado mais eficiente, ela não foi otimizada para este tipo de lesão; primeiro por ter sido uma classificação modificada a partir de uma já existente proposta por Richard em 1968 e utilizada para colón de útero; segundo por esta classificação ter sido proposta para displasias intraorais a partir de estudos prognósticos nesse tipo de lesão (Kujan et al., 2006). Sendo assim, parecem pertinentes estudos que possam analisar

mais profundamente a validade dessa classificação para lesões de queilite actínica, uma vez que essas mostram, como discutido anteriormente, diversas diferenças e particularidades em relações às lesões intraorais.

Assim, por final, podemos reduzir essas reflexões a: no lábio há dois tipos de lesão uma benigna, todavia com um poder de malignização, a queilite actínica; e uma maligna o carcinoma epidermoide. Tendo a primeira um consenso de ser um estágio antecessor ao aparecimento da segunda. De qualquer forma, mais estudos que ajudem na interpretação do comportamento dessas lesões, e que ajudem comprovar alterações em genes e proteínas, são necessários, assim como uma classificação que seja mais apropriada a esse tipo de lesão.

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, sugere-se que a queilite actínica deva ser tratada clinicamente como uma lesão única independente de seu grau histológico de displasia, já que não se pode comprovar a real progressão desta lesão com sua passagem por todos os estágios displásicos possíveis em um epitélio.

Quando classificada a displasia, o mais eficiente seria a utilização de um sistema com o menor número de divisões, como no caso do sistema binário.

REFERÊNCIAS¹

Acha-Sagredo A, Ruesga MT, Rodriguez C et al. p53 mutation is rare in oral mucosa brushings from patients previously treated for a head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2009; 45(8): 661-4

Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmüller L, Deppert W. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene.* 1999; 18(53):7706-17.

Agarwal S, Mathur M, Srivastava A, Ralhan R. MDM2/p53 coexpression in oral premalignant and malignant lesions: potential prognostic implications. *Oral Oncol.* 1999; 35:209-16.

Aragane Y, Kulms D, Metze D et al. Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently from its ligand CD95L. *J Cell Biol.* 1998; 140: 171–82.

Barnes L, Eveson JW, Reickart P, Sidransky D. World Health Organization. Classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. IARC Press: Lyon 2005. 430p

Baima B, Sticherling M: Apoptosis in different cutaneous manifestations of lupus erythematosus, *Br J Dermatol.* 2001; 144: 958-66.

Benjamin CL, Ullrich SE, Kripke ML, Ananthaswamy HN. p53 tumor suppressor gene: a critical molecular target for UV induction and prevention of skin cancer. *Photochem Photobiol.* 2008; 84(1): 55-62.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver. Abreviatura de Periódicos segundo as bases Medline

Blandino G, Levine AJ, Oren M. Mutant p53 gain of function: differential effects of different p53 mutants on resistance of cultured cells to chemotherapy. *Oncogene*. 1999; 18(2): 477-85.

Brennan JA, Mao L, Hruban RH et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Méd*. 1995; 332: 429.

Cataldo E, Doku C .Solar cheilitis. *J Dermol Surg Oncol*. 1981; 7: 989-95.

Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 66: 498–503.

Chen L, Park SM, Tumanov AV et al. CD95 promotes tumour growth. *Nature*. 2010; 465: 492-96.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995; 81(4): 505-12.

Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ("actinic keratosis"). *J Am Acad Dermatol*. 2000; 42: 11-17.

Colman MS, Afshari CA, Barrett JC. Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. *Mutat Res*. 2000; 462(2-3): 178-88.

Crosthwaite N, Teale D, Franklin C, Foster GA, Stringer BM. p53 protein expression in malignant, pre-malignant and non-malignant lesions of the lip. *J Clin Pathol*. 1996; 49(8): 648-53.

Cosulich SC, Savory PJ, Clarke PR. Bcl-2 amplification of caspase activation by cytochrome c. *Curr Biol*. 1999; 9(3): 147-50.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004; 116(2): 205-19.

Dumaz N, Drougard C, Sarasin A, Daya-Grosjean L. Specific UV-induced mutation spectrum in the p53 gene of skin tumors from DNA-repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(22): 10529-33.

Feinmesser M, Tsabari C, Fichman S, Hodak E, Sulkes J, Okon E. Differential expression of proliferation- and apoptosis-related markers in lentigo maligna and solar keratosis keratinocytes. *Am J Dermatopathol*. 2003; 25:300–7.

Filipowicz E, Adegboyega P, Sanchez RL, Gatalica Z. Expression of CD95 (Fas) in sun-exposed human skin and cutaneous carcinomas. *Cancer*. 2002; 94(3): 814-9.

Freitas MCA, Ramalho LMP, Xavier FCA, Moreira ALG, Reis SRA. P53 and MDM2 protein expression in actinic cheilitis. *J Appl Oral Sci*. 2008; 16(6): 414-9.

Garcia-Montesinos-Perea B, Val-Bernal JF, Saiz-Bustillo R. Epidermoid carcinoma of the lip: an immunohistochemical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005; 10(5): 454-6

Gilbert S, Ruel A, Loranger A, Marceau N. Switch in Fas-activated death signaling pathway as result of keratin 8/18-intermediate filament loss. *Apoptosis*. 2008; 13: 1479–1493.

Guo CB, Cui LH, Yu GY, et al. Endogenous fatty acid synthesis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000; 38: 506–8.

Guo M, Hay BA. Cell proliferation and apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 1999; 11(6): 745–52.

Harada JN, Berk AJ. P53-independent and –dependent requirements for E1B-55 in adenovirus type replication. *J Virol*. 1999; 73(7); 5333-44.

Hasson O. Squamous cell carcinoma of the lower lip. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 66: 1259-62.

Hernandez L, Fest T, Cazorla M et al. P53 gene mutations and protein overexpression are associated with aggressive variants of mantle cell lymphomas. *Blood*. 1996; 87(8): 3351-9.

Holzer AM, Athar M, Elments CA. The other end of: infrared and skin. *J Invest Dermatol*. 2010; 130(6): 1496-9.

Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. *Lung Cancer*. 2001; 34: S7–S15.

Jonason AS, Kunala S, Price GJ et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc. Natl Acad. Sci USA*. 1996; 93; 14025–14029.

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997; 275(5303): 1132-6.

Kobzdej M, Matuszyk J, Ziolo E, Strzadala L. Changes in glucocorticoid-induced apoptosis and in expression of Bcl-2 protein during long-term culture of thymic lymphoma. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2000; 48(1): 43-6.

Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, et al. Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck*. 1999; 21: 325–9.

Krunic AL, Garrod DR, Madani S, Buchanan MD, Clark RE. Immunohistochemical staining for desmogleins and 2 in keratinocytic neoplasms with squamous phenotype, actinic keratosis, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Cancer*. 1998; 77: 1279.

Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(16): 7491-5.

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

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

Lane DP. Cancer. p53, guardian of genome. *Nature*. 1992; 358(6381): 15-6.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979; 278, 261–263.

Lee JK, Kim JH, Nam KT, Lee SH. Molecular events associated with apoptosis and proliferation induced by ultraviolet-B radiation in the skin of hairless mice. *J Dermatol Sci.* 2003; 32: 171–9.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature.* 1991; 351(6326): 453-6.

Levine AJ, Perry ME, Chang et al. The role of p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer.* 1994; 69(3): 409-16

Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(10): 749-58.

Loro LL, Vintermyr OK, Liavaag PG, Jonsson R, Johannessen AC. Oral squamous cell carcinoma is associated with decreased bcl-2/bax expression ratio and increased apoptosis. *Hum Pathol.* 1999; 30(9): 1097–105.

Martinez A, Brethauer U, Rojas IG, Spencer M, Mucientes F, Borlando J, Rudolph MI. Expression of apoptotic cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34: 257-62.

Martinez A, Brethauer U, Borlando J, Spencer ML, Rojas IG. Epithelial expression of p53, mdm-2 and p21 in normal lip and actinic cheilitis. *Oral Oncol.* 2008; 44(9): 878-83.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene.* 1999; 18(53): 7621-36.

Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7: 763–77.

Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous system and retained in the adult PNS. *Development*. 1994; 120(2): 301-11.

Murphy M, Mabruk MJ, Lenane P, et al. The expression of p53, p21, bax and induction of apoptosis in normal volunteers in response to different doses of ultraviolet radiation. *Br J Dermatol*. 2002; 147: 110–7.

Muzio M, Salvesen GS, Dixit VM. FLICE induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem*. 1997; 272: 2952–6.

Nagata M, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama K, Loh D, Watanabe T. Apoptosis during an early stage of nephrogenesis induce renal hypoplasia in bcl-2-deficient mice. *Am J Pathol*. 1996; 148(5): 1601-11.

Nakazawa HD, English PL, Randell K, Nakazawa N, Martel BK, Yamasaki H. UV and skincancer: Specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc. Natl Acad. Sci USA*. 1994; 91: 360–364.

Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS, Balfour CA, Wymer JA, Welch KL et al. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers, *Cancer Lett*. 1994; 85: 23–29.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, 758p.

Nico MMS, Rivitti EA, Lourenço V. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol*. 2007; 34: 309-14.

Oishi M, Maeda K, Sugiyama S. Distribution of apoptosis mediating Fas antigen in human skin and effects of anti-Fas monoclonal antibody on human epidermal

keratinocyte and squamous carcinoma cell lines. *Arch Dermatol Res.* 1994; 286: 396–407.

Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nat Immunol.* 2003; 4(5): 410-5.

Oram Y, Orengo I, Baer SC, Ocal T. P53 protein expression in squamous cell carcinoma from sun-exposed and non-sun-exposed sites. *J Am Acad Dermatol.* 1994; 31; 417.

Ortonne JP. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *British J dermol.* 2002; 146: 20-23.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer.* 1993; 54(4): 594-606.

Peter ME, Krammer PH. Mechanism of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol.* 1998; 10: 545–51.

Picascia DD, Robinson JK. Actinic cheilitis: A review of the etiology differential diagnosis, and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 1987; 17: 255-260.

Pimentel DRN, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic cheilitis: histopathology and p53. *J Cutan Pathol.* 2006; 33: 539-544.

Pindborg JJ, Reibel J, Holmstrup P. Subjectivity in evaluating oral epithelial displasia, acarcinoma in situ an initial carcinoma. *J Oral Pathol.* 1985; 14(9); 698-708.

Pinto LS, de Aguiar FC Jr, Kowalski LP, Graner E, Lopes MA. Fas and ErbB2 expression in na early local recurrent oral cancer. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39(2): 176-81.

Queille S, Luron L, Spatz A, Avril MF, Ribrag V, Duvillard P et al. Analysis of skin cancer risk factors in immunosuppressed renal transplant patients shows high levels of UV-specific tandem CC to TT mutations of the p53 gene. *Carcinogenesis*. 2007; 28: 724–731.

Regezi JA, Sciubba JJ. *Patologia Bucal: correlações clinicopatológicas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 475p.

Ren, ZP, Hedrum A, Ponten FJ et al. Human epidermal cancer and accompanying precursors have identical p53 mutations different from p53 mutations in adjacent areas of clonally expanded non-neoplastic keratinocytes. *Oncogene*. 1996;12; 765–773.

Ribeiro DA, Salvadori DM, Marques ME. Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Int J Exp Pathol*. 2005; 86(6): 375-81.

Rolland SG, Conradt B. New role of the BCL2 family of proteins in the regulation of mitochondrial dynamics, *Curr Opin Cell Biol*. 2010; 22: 1-7.

Richard RM. Natural history cervical intraepithelial neoplasia. *Modern treatment*. 1968; 5: 1

Salasche SJ. Epidemiology of the actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermol*. 2000; 42: 4-7.

Sanchez-Conejo-Mir J, Perez Bernal AM, Moreno-Gimenez JC, Camacho-Martinez F. Follow-up of vermillionectomies: evaluation of the technique. *J Dermatol Surg Oncol*. 1986; 12: 180-184.

Sato M, Nishigori C, Zghal M, Yagi T, Takebe H. Ultraviolet-specific mutations in p53 gene in skin tumors in xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res*. 1993; 53(13): 2944-6.

Schneider-Stock R, Mawrin C, Motsch C, Boltze C, Peters B, Hartig R. Retention of the arginine allele in codon 72 of the p53 gene correlates with poor apoptosis in head and neck cancer. *Am J Pathol*. 2004; 164(4): 1233-41

Schorr K, Li M, Krajewski S, Reed JC, Furth PA. Bcl-2 gene family and related proteins in mammary gland involution and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1999; 4(2): 153-64.

Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene*. 2004; 23(16): 2809-18.

Shen Y, White E. p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res*. 2001; 82: 55-84.

Silva SD, Cunha IW, Rangel ALCA, et al. Differential expression of fatty acid synthase (FAS) and ErbB2 in nonmalignant and malignant oral keratinocytes. *Virchows Arch*. 2008; 453: 57–67.

Silva SD, Perez DE, Alves FA, et al. ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: correlation with clinical outcomes. *Oral Oncol*. 2007; 44: 484–90.

Sionov RV, Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*. 1999; 18(45): 6145-57.

Srinivas G, Kusumakumary P, Nair MK, Panicker KR, Pillai MR. Bcl-2 protein and apoptosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Med*. 1998; 1(4): 755-9.

Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 2009; 30: 180–192.

Thomadaki H, Scorilas A. BCL2 family of apoptosis-related genes: function and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2006; 43(1): 1-67.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. 1984; 226(4678): 1097–9.

Ulrich M, González S, Lange-Asschenfeldt B, Roewert-Huber J, Sterry W. Non-invasive diagnosis and monitoring of actinic cheilitis with reflectance confocal microscopy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010. No prelo

Von Freeden-Jeffry U, Solvason N, Howard M, Murray R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity*. 1997;7(1): 147–54.

Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell*. 2009; 137: 413–431.

Wang XW, Harris CC. p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J Cell Physiol*. 1997; 173(2): 247-55.

Wang XY, Zhang R, Lian S. Aberrant expression of fas and FasL pro-apoptotic proteins in basal cell and squamous cell carcinomas. *Clin and Exper Dermatol*. 2010. No prelo

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37(3): 127-33.

Wu HG, Gong X, Yao LQ, Zhang W, Shi Y, Liu HR et al. Mechanisms of acupuncture and moxibustion in regulation of epithelial cell apoptosis in rat ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2004; 10(5): 682-688.

Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Mizuno A. p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 94: 593–600.

Yang, X, Rhosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D: DAXX, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*. 1997; 89: 1067-1076.

Yokko K, Noma I, Hashimoto S, Shimono M. Cell proliferation tumour suppressor gene expression in iodine unstained area surrounding oral squamous cell carcinoma. In *J Oral Maxillfac*. 2004; 33: 75.

Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ et al. Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature*. 1994; 372: 730–731.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR – 243860
Protocolo 10/2009

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "**ESTUDO DA MUTAÇÃO DE P53 (C-T) E ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA E IMONOISTOQUÍMICA DE P53, BCL2 E FAS EM QUELITE ACTÍNICA E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO**", de responsabilidade da Pesquisadora Alexandra Fontes da Costa, sob orientação da Profa. Dra Marília Trierveiler Martins.

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

São Paulo, 12 de março de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP