JOELMA SOUSA LIMA

**Expressão imunohistoquímica das proteínas c-Jun não fosforilada/fosforilada
e p27 em leucoplasias de pacientes fumantes e não fumantes**

São Paulo

2012

JOELMA SOUSA LIMA

**Expressão imunohistoquímica das proteínas c-Jun não fosforilada/fosforilada
e p27 em leucoplasias de pacientes fumantes e não fumantes**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia da Universidade de São
Paulo, para obter título de Mestre, pelo
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia

Área de Concentração: Patologia
Bucal

Orientador: Profa. Dra. Suzana C.
Orsini Machado de Sousa

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Lima, Joelma Sousa.

Expressão imunohistoquímica das proteínas c-Jun não fosforilada/fosforilada e p27 em leucoplasias de pacientes fumantes e não fumantes / Joelma Sousa Lima ; orientador Suzana C. Orsini Machado de Sousa. -- São Paulo, 2012.

87 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Leucoplasia bucal. 2. Tabagismo. 3. Proteínas. I. Sousa, Suzana C. Orsini Machado de. II. Título.

Lima JS. Expressão imunohistoquímica das proteínas c-Jun não fosforilada/fosforilada e p27 em leucoplasias de pacientes fumantes e não fumantes. Dissertação apresentada à faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). (a). _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A Deus, a Quem eu devo tudo, sem Ele eu nunca chegaria até aqui.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Diva e Vinícius, que sempre me ensinaram o caminho do bem. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos, Joel, Nice e Novinha por me proporcionarem momentos de muitas risadas e torcida constante.

Aos meus tios e tias, pelo imenso amor e carinho.

Aos meus queridos amigos de longa data, Riccardo, Amélia , Ademar, Thelma ,Clemente, Mari, Reginaldo e Raquel pela amizade, companheirismo e apoio sempre presentes.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Suzana C. Orsini Machado de Sousa, pela oportunidade que me deu em realizar este sonho, pela boa vontade em ajudar, pelos valiosos ensinamentos e senso de direção assertivo. Um exemplo de profissionalismo e ser humano, comprometida com o ensino e aprendizagem. Meus sinceros agradecimentos por tornar esta travessia mais leve.

À Profa. Dra. Luciana Corrêa, a quem tanto admiro. Obrigada pela grandiosa ajuda neste trabalho e em outros. Serei sempre grata por tudo que me ensinou.

Aos Professores da disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, Profa. Marília Trierveiler Martins, Profa Marina Helena C. Gallottini, Prof. Décio dos Santos Pinto Jr., Prof. Fábio Daumas Nunes, Profa. Andrea Mantesso e Profa Karen Lopez Ortega pela dedicação à docência e pesquisa.

À Fátima pela amizade que surgiu de maneira inesperada, sempre disposta a me ajudar em todos os momentos.

Aos colegas e amigos de pós-graduação Gabi, Carol, Bruno, Nelise, Tathi, Rita, Fabi, Felipe, Fernanda, Carina, Bianca, Ana Patrícia, Priscila, Marco Túlio, Catalina, Lu, Karin, Fábio Prosdócimo, Paula, Douglas, entre outros pelo companheirismo e a convivência amistosa. Agradeço, em especial a Ju, Dani e Cau pelas nossas conversas e encontros fora da faculdade super divertidos.

Obrigada aos funcionários do Departamento de Patologia Bucal: Zilda, Néia, Nair, Elisa, Adriana, Juvani e Bia por todo o suporte e empenho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

À FOU SP minha maior conquista.

RESUMO

Lima JS. Expressão imuno-histoquímica das proteínas c-Jun não fosforilada/fosforilada e p27 em leucoplasias de pacientes fumantes e não fumantes. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

Em diversos casos, o câncer bucal é precedido por lesões pré-malignas, como por exemplo, a leucoplasia, sendo que o tabaco é um fator de risco. No entanto, apesar deste potencial negativo, há estudos limitados em fumantes e não fumantes sobre o desenvolvimento de displasia para carcinoma. Sabe-se que o principal componente do factor de transcrição AP-1, a proteína c-Jun e a sua forma fosforilada (p-c-Jun), participam do ciclo celular e que sua inibição compromete a proliferação celular. A proteína p27 tem sido demonstrada como inibidora de quinase, e sabe-se que tem sua expressão diminuída durante a carcinogênese. A expressão diminuída de p27 tem sido relacionada a um pior prognóstico em carcinoma epidermóide. O objetivo deste estudo foi verificar a expressão das proteínas c-Jun, p-c-Jun e p27, em lesões potencialmente malignas diagnosticadas clinicamente como leucoplasia de pacientes fumantes e não fumantes. Foram selecionados 73 casos diagnosticados clinicamente como leucoplasias, os quais foram divididos nos seguintes grupos: leucoplasia com e sem displasia epitelial, e entre fumantes e não fumantes (perfazendo 4 grupos). Cortes histológicos das lesões foram classificados segundo o sistema de graduação binário, e subsequentemente submetidos à técnica imunohistoquímica da estreptoavidina-biotina. Avaliou-se também a associação da proliferação celular pela c-Jun, p-c-Jun e p27 com o tabagismo, presença e ausência de displasia, localização e gênero. O presente estudo verificou que ocorrência de displasia epitelial em baixo e alto risco não teve associação com o hábito de fumar do paciente ($p=0,5430$). Avaliando apenas a imunorreatividade das proteínas c-Jun, p-c-Jun e p27 individualmente observou-se que a expressão destas não teve associação com a condição fumante do paciente ($p>0,05$). Porém, ao compararmos a imunomarcagem de c-Jun e p-c-Jun entre si, no total da amostra ($p=0,0448$) e somente para displasia em fumantes ($p=0,0165$), nota-se significativamente menor expressão de p-c-Jun. Comparando c-Jun e p27 nas displasias em não fumantes,

houve significativamente maior expressão de c-Jun e menor expressão de p27 ($p=0,0079$). A análise do Teste binomial de duas proporções revelou que as regiões de língua e assoalho bucal estavam associadas à ocorrência de lesões displásicas quando comparadas a lesões não displásicas ($p<0,0001$). Concluiu-se que não houve correlação entre fumo e grau de displasia. A expressão das proteínas c-Jun, p-c-Jun e p27 foi independente da condição fumante do paciente.

Palavras chaves: Leucoplasia Oral, Displasia epitelial, Tabagismo, Proteína c-Jun, Proteína p-c-Jun, Proteína p27.

ABSTRACT

Lima JS. Immunohistochemical expression of non-phosphorylated / phosphorylated c-Jun and p27 proteins in leukoplakias from smokers and nonsmokers. Dissertation. São Paulo, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão Corrigida.

In Several cases, the oral cancer is preceded by-malignant lesions potentially, such as leukoplakia, and that tobacco is a risk factor. However, despite this negative potential, there are limited studies in smokers and nonsmokers on the development of dysplasia to carcinoma. It is known that the main component of the transcription factor AP-1, c-Jun protein and its phosphorylated form (pc-Jun), participate in cell cycle inhibition and their committed cell proliferation. The p27 protein has been shown to inhibit kinase, and it is known that their expression is decreased during carcinogenesis. The decreased expression of p27 has been linked to poor prognosis in squamous cell carcinoma. The aim of this study was to evaluate the expression of proteins c-Jun, pc-Jun and p27 in potentially malignant lesions from smokers and non-smokers, diagnosed clinically as leukoplakiaa in smokers and nonsmokers. We selected 73 cases diagnosed clinically as leukoplakia, which were divided into the following groups: leukoplakia with and without dysplasia, and between smokers and nonsmokers (totaling 4 groups). Histological lesions were classified according to the binary grading system, and subsequently subjected to immunohistochemistry technique streptavidin-biotin. We also evaluated the association of cell proliferation of c-Jun, pc-Jun and p27 with smoking, presence and absence of dysplasia, location and gender. This study found that the occurrence of epithelial dysplasia in low-and high-risk had no association with the patient's smoking habit ($p = 0,5430$). When evaluating the immunoreactivity of the proteins c-Jun, p27 and pc-Jun alone it was observed that the expression of them was also independent of the condition of the patient smoking ($p > 0,05$). However, when comparing the immunostaining of c-Jun and pc-Jun together, for the total sample ($p = 0,0448$) and only for dysplasia in smokers ($p = 0,0165$), there was significantly lower expression of pc-Jun. Comparing p27 and c-Jun in dysplasias in nonsmokers, there was significantly higher expression of c-Jun and reduced expression of p27 ($p = 0,0079$). The analysis of two binomial

proportions test revealed that the lesions in the tongue and floor of the mouth were more prone to be dysplastic ($p < 0.0001$). It was concluded that there was no correlation between smoking and degree of dysplasia. The expression of c-Jun, p27 and pc-Jun proteins was independent of smoking habit of the patient. The anatomoclinical aspects combined with the expressions of c-Jun and p27 may assist the pathologist in directing the histopathological diagnosis.

Keywords: Oral leukoplakia. Epithelial dysplasia. Tobacco. c-Jun protein, pc-Jun protein, p27 protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Modelo conceitual para o entendimento de mecanismo carcinogênico do tabaco (IARC, 2012).....	22
Figura 2.2 - Estrutura da proteína c-Jun.....	30
Figura 5.1 - Fragmento de mucosa removido de um paciente, com histórico de leucoplasia, entretanto sem a presença de displasia epitelial.....	50
Figura 5.2 - Fragmento de mucosa removido de paciente com histórico de leucoplasia, desta vez, apresentando áreas de displasia epitelial	51
Figura 5.3 - Representação imuno-histoquímica do padrão de coloração de c-Jun, p-c-Jun, p27	56
Figura 5.4 - Representação imuno-histoquímica da expressão de c-Jun no total da amostra	58
Figura 5.5 - Representação imuno-histoquímica da expressão de p-c-Jun no total da amostra	59
Figura 5.6 - Representação imuno-histoquímica da expressão de p-c-Jun no total da amostra	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Carcinógenos do tabaco avaliados pela IARC	23
Tabela 2.2 - Desregulação dos membros da família JUN no câncer	34
Tabela 4.1 - Critérios estabelecidos pela OMS para classificação de displasia epitelial	43
Tabela 5.1 - Frequência de lesões displásicas e não displásicas, de acordo com hábito de fumar	49
Tabela 5.2 - Mediana da idade (mínimo e máximo) de acordo com hábito de fumar em lesões displásicas e não displásicas	52
Tabela 5.3 - Frequência de lesões displásicas e não displásicas de acordo com hábito de fumar e gênero	53
Tabela 5.4 - Frequência de lesões displásicas e não displásicas de acordo com hábito de fumar e localização.....	54
Tabela 5.5 - Mediana do tamanho-mm (mínimo e máximo) de acordo com hábito de fumar em lesões displásicas e não displásicas.....	55
Tabela 5.6 - Mediana do tempo de duração das lesões displásicas e não displásicas, em meses (mínimo e máximo), de acordo com hábito de fumar	55
Tabela 5.7 - Imunopositividade para c-Jun de acordo com padrão de marcação	61
Tabela 5.8 - Imunopositividade para p-c-Jun de acordo com padrão de marcação .	62
Tabela 5.9 - Número de casos para p27 de acordo com padrão de marcação.....	63

Tabela 5.10 -Imunomarcção de c-Jun, p-c-Jun e p27 na amostra total	65
Tabela 5.11 -Frequência de casos com marcação positiva >20% para cJun, p-c-Jun e p27 de acordo a localização anatômica	67
Tabela 5.12 -Frequência de casos com marcação positiva >20% para os marcadores analisados segundo o gênero	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 2.1 - Número anual de mortes por câncer atribuível ao fumo de acordo com sexo e localização	22
Gráfico 5.1 - Representação gráfica da positividade ao c-Jun.....	61
Gráfico 5.2 - Representação gráfica da positividade ao p-c-Jun	62
Gráfico 5.3 - Representação gráfica da positividade ao p27	63
Gráfico 5.4 - Imunomarcção de c-Jun, p-c-Jun e p27na amostra geral	65
Gráfico 5.5 - Representação gráfica das frequências de casos com positividade >20% para os marcadores em lesões displásicas e não displásicas ...	66
Gráfico 5.6 - Representação gráfica das frequências de casos com positividade >20% para as localizações em língua e assoalho bucal em lesões displásicas e não-displásicas	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
5 RESULTADOS.....	49
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS	87

1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico precoce do câncer bucal ainda é a melhor forma de aumentar a sobrevida dos pacientes e reduzir os índices de mortalidade. Vários estudos têm levado ao pensamento de que talvez todos, ou a maioria dos cânceres bucais, sejam precedidos por um período, durante o qual, o epitélio mostra sinais de alterações designadas “displasia” e o potencial para desenvolver o carcinoma invasivo aumenta com a severidade desta. Portanto, o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na iniciação e progressão para a malignidade do câncer oral pode ajudar num melhor prognóstico e na elaboração de novas formas de tratamento.¹⁻⁴

A leucoplasia é a lesão potencialmente maligna mais comum na mucosa oral. Ao exame microscópico, esta apresenta padrão variável, podendo apresentar alterações epiteliais displásicas ou não. A displasia quando presente geralmente é classificada em leve, moderada ou intensa de acordo com a extensão de anormalidades histomorfológicas observadas no epitélio. A etiologia das leucoplasias é variável, sendo que o tabaco tem sido apontado como um provável fator de risco, entretanto o papel deste na transformação maligna é controverso e incerto.³⁻⁷

Até o momento, não existem fatores clinicopatológicos ou biomarcadores moleculares confiáveis que permitam prever a progressão para malignidade em cada lesão⁸. Diversos estudos mostram que certas características das lesões denominadas potencialmente malignas (LPM) indicam o maior risco para a transformação maligna. Essas características incluem: gênero feminino, longa duração, lesões maiores que 200mm², leucoplasia em não-fumante, localização em língua e assoalho bucal, presença de displasia, perda de heterozigose e aneuploidia de DNA. Dessa forma, a identificação de marcadores moleculares em LPM pode auxiliar na compreensão do risco de transformação em carcinoma.^{9,10,11}

A expressão de diversas proteínas do ciclo celular tem sido estudada em uma quantidade de lesões orais malignas. Entre as principais destaca-se a p27, que é codificada pelo gene supressor de tumor de mesmo nome, e atua como um regulador negativo do ciclo celular, independente da p53, e está envolvida na parada da fase G1 do ciclo celular.¹²⁻¹⁵ Alterações na expressão da p27 têm sido

encontradas em carcinomas, incluindo os da cavidade oral, assim como a diminuição da sua expressão tem sido relacionada com um pior prognóstico.¹⁶⁻¹⁸

Outra proteína, de nome c-Jun, desempenha papel importante no controle do ciclo celular. A mesma é codificada por um proto-oncogene, e atua como um regulador positivo do ciclo celular, através de outras vias de sinalização, incluindo a MAP quinase e Akt, que bloqueia a atividade do p27¹⁴⁻¹⁶. Entre outras proteínas, a c-Jun forma o principal componente do fator de transcrição ativador de proteína 1 (AP-1), importante para a proliferação e diferenciação celular. Estudos em que foram analisados a expressão de c-Jun em relação à mucosa oral normal e o carcinoma epidermóide oral (CEO), comparando com as lesões pré-malignas, apresentaram evidências do papel da c-Jun na carcinogênese oral.^{19,20}

Embora a expressão das proteínas p27 e c-Jun mostre alterações com relação às lesões pré-malignas e malignas^{17,19,20}, não há estudos envolvendo pacientes tabagistas e não tabagistas, que abordem estas relações na carcinogênese oral. Diante disso, este projeto se propõe a avaliar a expressão das proteínas c-Jun, p-c-Jun e p27 em pacientes fumantes e não fumantes, com ou sem displasia, nas lesões leucoplásicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Leucoplasia

O termo “leucoplasia” foi descrito pela primeira vez pelo húngaro Schwimmer, em 1877 para descrever o aspecto clínico das lesões brancas presentes na mucosa oral (apud Monteil²¹, 1983). Infelizmente o uso desta, para fins de diagnóstico em patologia oral, gerou muita confusão devido a sua utilização ampla e irrestrita, sendo então estabelecidos rigorosos critérios clinicopatológicos para descrever as placas brancas sem causa definida. Desde então, diversas definições têm sido reportadas na literatura objetivando uniformizar critérios de diagnóstico com base no entendimento da doença atual.^{2,8,22,23}

Em 2005 a Organização Mundial da Saúde (OMS) atualizou esta definição e passou a identificar a leucoplasia (LO) como “placa branca de questionável risco, havendo excluído outras doenças ou condições que não possuem potencial aumentado de transformação maligna.”²

Leucoplasia é um diagnóstico clínico provisional inicial, baseado nos aspectos clínicos, após descartar a hipótese de candidíase pseudomembranosa aguda, leucoedema, leucoceratose do palato, causado por nicotina, enxerto de pele, e após a eliminação de possíveis fatores causais como: queimadura química, irritação mecânica (queratose friccional), hábito crônico de morder bochecha ou lábio (morsicatio buccarum)⁷. Neste caso, espera-se de duas a quatro semanas para observar a regressão ou desaparecimento da placa branca. Em tais situações, a biópsia é contraindicada. O tratamento consiste na remoção do fator causal. Lesões como candidíase devem ser reavaliadas depois de três semanas de terapia tópica antifúngica contínua.^{23,24}

Após a remoção destes fatores, se a placa branca persistir deverá ser realizada a biópsia, para descartar outras lesões conhecidas como líquen plano, incluindo lesões liquenóides, papiloma, lúpus eritematoso, leucoplasia pilosa e nevo branco esponjoso. Excluindo essas lesões e a presença de malignidade, o diagnóstico é fechado em hiperplasia/hiperqueratose com ausência ou presença de displasia.^{1,25-28}

Histologicamente, a LO pode apresentar desde atrofia a hiperplasia epitelial não displásica com ou sem hiperqueratose. Displasia epitelial, se presente, pode variar de leve a intensa, de acordo com os achados citológicos e os distúrbios indicativos de maturação, tais como: pleomorfismo nuclear e celular, hipercromatismo, aumento do número de mitoses, duplicação da camada basal, etc (Tabela 4.1). A composição das várias anormalidades citológicas e distúrbios arquiteturais constituem os critérios para graduar displasia epitelial. Contudo, a displasia é um espectro e não existem critérios reproduzíveis para delimitar precisamente este espectro nas categorias: leve, moderado e intenso ou baixo e alto risco.^{3,25}

2.1.2 Incidência

A LO possui maior incidência em pacientes do gênero masculino^{27,28}, atingindo ampla faixa etária, principalmente acima dos 40 anos. Pode afetar qualquer região da cavidade oral, sendo que alguns estudos apontam a mucosa jugal como o sítio de maior incidência^{8,28,29}, enquanto outros reportam assoalho e língua ou gengiva/rebordo alveolar.³⁰

A leucoplasia afeta 0.2 a 4.9% da população em geral³¹, enquanto a incidência de transformação maligna é bastante controversa. Estudos têm apontado um potencial maligno em 36 % quando a lesão apresenta aspectos displásicos^{32,33}. Quando as lesões displásicas e não displásicas são analisadas juntas, o percentual de transformação maligna diminui entre 0.13 a 17.5%³⁴, sendo 1% uma posição realista¹⁰.

De acordo com Reibel¹ (2003) a taxa de transformação maligna pode variar de 4% a 6%, ou chegar a 18% dependendo da população estudada e dos hábitos prevalentes, particularmente, em determinadas regiões geográficas.

Por outro lado, Woo e Lin³⁵ (2009) demonstraram em seu estudo que a inclusão da queratose alveolar benigna, no grupo da leucoplasia, causa diluição dessa porcentagem. Em contrapartida, quando essa entidade é excluída deste grupo, a taxa de transformação maligna da displasia em carcinoma, aumenta de

18% para 25%. O autor sugere que essa diferença é atribuída aos critérios utilizados para definir leucoplasia.

2.1.3 Etiologia

A etiologia da leucoplasia é bastante variável, alguns autores citam fatores, como: o consumo habitual de álcool, a presença de fungos do gênero *Cândida*, idiopática (etiologia desconhecida) e o fumo^{22,28,36-39}.

O consumo crônico de álcool é ainda controverso na literatura. Alguns estudos têm relatado o álcool como um fator de risco independente para a leucoplasia²⁸. No entanto, outros não encontraram qualquer associação entre o consumo de álcool e leucoplasia.⁶

A infecção por *Cândida* é outro fator que permanece controverso, se é uma das causas da leucoplasia ou se se trata de uma infecção sobreposta numa lesão pré-existente.^{12,36}

Jaber et al.³⁷ (1999) estudando displasia, salientaram que o desenvolvimento desta foi influenciado sinergicamente pelo consumo de tabaco e álcool.

Pesquisadores na Suécia, estudando a evolução da leucoplasia, descrevem que após 10 anos todos os indivíduos que progrediram para malignidade eram fumantes e alcoólatras moderados⁴⁰. Outro estudo conduzido por Lim et al.⁴¹ (2003) observou que o risco, para desenvolver lesão maligna e potencialmente maligna, aumentou em até 350 vezes, quando indivíduos consumiam mais de 20 cigarros por dia, tanto homens quanto em mulheres.

O hábito de fumar mais de 20 cigarros por dia foi associado ao risco aumentado de aparecimento dessa lesão de 2,4 a 15 vezes⁴². Entretanto indivíduos não fumantes parecem ter maior risco para desenvolver a malignização e pior prognóstico após cinco anos do tratamento cirúrgico^{28,38}. Outros estudos apontam que mulheres não tabagistas possuem maior risco de progressão para malignidade.^{32,33}

A associação do tabagismo na progressão para malignidade foi analisada por Silverman et al.³² (1984), que relataram um menor potencial de transformação maligna em pacientes fumantes, quando comparados aos pacientes não fumantes.

Neste estudo, onde 257 pacientes portadores de leucoplasia oral foram analisados, 183 fumantes, 12% desenvolveram carcinoma. No grupo onde 74 pacientes analisados não eram fumantes, 32% progrediram para carcinoma oral. Outros estudos, como o conduzido por Schepman et al.³³ (1998), em que 166 pacientes com leucoplasia oral foram analisados, mostrou que as mulheres não fumantes apresentaram maior risco de transformação maligna, quando comparadas às mulheres fumantes.

Diversos autores não observaram fator de risco significativo entre fumo e maior susceptibilidade à malignização, porém os autores descrevem que a leucoplasia, quando associada ao tabagismo, parece possuir um menor potencial de malignidade, do que a relacionada ao não tabagismo.^{6,7,43,44}

2.1.4 Subtipos de leucoplasia

O aspecto clínico de leucoplasia varia de lesões homogêneas a não-homogêneas. Leucoplasia homogênea é definida como uma lesão de superfície lisa e uniforme, limites regulares e algumas vezes podendo apresentar fissuras rasas. Leucoplasia não homogênea é definida como uma lesão de coloração esbranquiçada com áreas avermelhadas, podendo apresentar padrão salpicado, verrucoso, superfície rugosa ou corrugada e nodular, no qual pode-se observar pequenos crescimentos polipoides.^{1,2, 12,34}

A leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), uma forma específica de leucoplasia, foi descrita por Hansen et al.⁴⁵ (1985). Pode apresentar-se em diversas regiões da cavidade oral, exibindo superfície verrucosa, exofítica ou nodular. Esta é uma forma agressiva de leucoplasia, e a maior parte dos casos de LVP sofre transformação maligna.^{34,46,47,48}

2.2. Tabagismo

O tabagismo é o ato de consumir cigarros ou quaisquer produtos derivados do tabaco (charuto, cigarrilhas, cachimbo, rapé e etc), enquanto fumante é aquele que consome tabaco de forma fumada^{49,50}. A OMS afirma que o tabagismo deve ser considerado uma pandemia, ou seja, uma epidemia generalizada, e como tal precisa ser combatido. A OMS estima que um terço da população adulta mundial seja fumante, o que equivale a 1,2 bilhões de pessoas, das quais 200 milhões são mulheres⁴⁹.

Pesquisas revelam que enquanto a prevalência de fumantes vem apresentando declínio em países desenvolvidos, a taxa de fumantes apresenta crescimento nos países em desenvolvimento. Em contrapartida, a participação das mulheres, que têm o hábito de fumar, mais do que triplica em países de alta renda. Em consequência, esse hábito é apontado como a principal causa de morte evitável em todo o mundo^{51,52}. Em 2011, esta epidemia já causou a morte de 6 milhões de pessoas, com 80% dessas mortes ocorrendo em países de baixa e média renda, entre as quais mais de 600.000 são pessoas expostas à fumaça do cigarro. No Brasil, atinge a cifra de 200.000 mortes/ano^{49,53,54}.

O fumo possui, em sua composição, dentre outras substâncias maléficas à saúde, constituintes cancerígenos, co-cancerígenos (catecol e compostos relacionados) e promotores de tumor, os quais estão envolvidos em todas as etapas desta cadeia de eventos, sendo responsável por diversos tipos de câncer, tais como: boca, laringe, pulmão, nasofaringe, orofaringe, esôfago, estômago, pâncreas, bexiga, rim, intestino e ovário. Suspeita-se que a fumaça do cigarro esteja também associada ao câncer de fígado e medula óssea (leucemia mielóide aguda), embora a conexão com essas neoplasias seja fraca^{49,52,55-59}. (Gráfico 2.1)

Source: Centers for Disease Control and Prevention. Smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses – United States, 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008;57(45):1226-1228.

American Cancer Society, Surveillance Research, 2012

Gráfico 2.1 - Número anual de mortes por câncer atribuível ao fumo de acordo com sexo e localização⁵²

O cigarro contém mais de 7000 constituintes químicos^{52,58}. Centenas destes são tóxicos e o número de agentes genotóxicos na fumaça do tabaco, avaliados pela International Agency Research for Cancer (IARC), para os quais existem evidências suficientes em humanos ou em animais de laboratórios, é de 69 carcinógenos⁵⁹. Estes incluem produtos de combustão, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), N-nitrosaminas específicas do tabaco 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) e N'-nitrosonornicotina (NNN), aminas aromáticas, entre outros (Tabela 2.1)⁵⁹.

Dentre os muitos carcinógenos presentes no tabaco, as nitrosaminas, descritas acima, requerem ativação metabólica para se ligar ao DNA, induzindo, desta maneira, modificações, desencadeando um possível papel na iniciação da carcinogênese^{55,56,58,59}. Contudo, o maior foco de pesquisas tem sido predominantemente sobre o benzo-pyrene (substituto para todos PAHs), e as nitrosaminas (NNK), por causa do potencial carcinogênico já bem estabelecido⁵⁹. Existem outros compostos no fumo do tabaco que também podem ser carcinogênicos, entretanto, ainda não foram avaliados pela IARC^{52,58,59}.

Tabela 2.1 - Carcinógenos do tabaco avaliados na IARC (2004)⁵⁹

Classe Química	Nº do Carcinógeno	Carcinógeno Representativo
PAHs e seus analogos heterociclicos	15	Benzo-pyrene(BaP) Benzantranceno
N-nitrosaminas	8	4- tabaco 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) N - nitrosonornicotine (NNN)
Aminas aromáticas	12	4-Aminobifenil 2- Naftilamina
Aldeídos	2	Formaldeído Acetaldeído
Fenóis	2	Catecol Ácido cafeico
Hidrocarbonetos voláteis	3	Benzeno 1,3-Butadieno Isopreno
Outros orgânicos	12	Óxido de etileno Acrilonitrila
Compostos inorgânicos	8	Cádmio Polônio-210

Fonte- Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC⁵⁹, 2012).

O potencial carcinogênico do tabaco pode ser medido de diversas maneiras^{55,57,59}.

1. Por meio da capacidade que as células epiteliais possuem em degradar os metabólitos do cigarro. Dentre esta, podemos citar: as classes de enzimas do citocromo P-450(CYP) e as Glutathione S-transferases (GSTs). GSTs são proteínas diméricas que catalisam reações conjugadas entre glutathione e substratos da fumaça do tabaco, como os radicais heterocíclicos aromáticos, para posterior eliminação^{59,60,61}.
2. Organoespecificidade - que se caracteriza pela afinidade das nitrosaminas por diversos tecidos alvos, dependendo da estrutura da nitrosamina e da espécie animal. A organoespecificidade de NNK para o pulmão, em roedores e humanos, suporta o seu papel potencial na gênese de câncer^{54,56}.
3. A condição de fumante do indivíduo, como tempo de exposição e frequência do consumo de cigarro, embora não haja um consenso na literatura a este respeito^{58,59}.
4. A habilidade na indução de tumores malignos em animais de laboratório, entre outros⁵⁵.

Dentre os mecanismos citados acima, existem diferenças individuais quanto ao risco de desenvolver câncer, os quais são provenientes da expressão e regulação coordenada de mecanismos enzimáticos e seu equilíbrio metabólico. Desse modo, a biotransformação do carcinógeno se dá comumente em 2 fases^{59,61,62}.

Na fase 1, certos epóxidos dos PAHs, encontrados na fumaça do cigarro e em outros produtos de combustão, podem ser tanto inativados pela classe de enzimas do Citocromo P-450 (CYP), que o transforma em substâncias mais hidrossolúveis, facilitando assim, sua excreção, como podem ser transformados em metabólitos mais reativos, denominados intermediários reativos ou adutos^{59,61,62}.

Na fase 2, quase sempre ocorre a inativação total do carcinógeno pelas família das enzimas GSTs, como GSTM-1, caso este ainda não tenha sido inativado na fase 1. Entretanto, se o carcinógeno não sofre inativação por essas enzimas, (P-450 ou GSTM-), tais intermediários mais reativos podem se ligar ao DNA^{59,61,62}.

Este processo, que converte um carcinógeno não reativo a uma forma que se liga ao DNA, é conhecido como ativação metabólica⁵⁵. Assim sendo, o equilíbrio entre a ativação metabólica e detoxificação varia entre indivíduos, e é provável que afete o risco de câncer, porque adutos de DNA são essenciais para o processo da carcinogênese^{59,60}.

Figura 2.1 - Modelo conceitual para o entendimento de mecanismo carcinogênico do tabaco (IARC⁵⁹, 2012)

Em adição ao seu papel na fase 2 de detoxificação, as GSTs também modulam a indução de outras enzimas e proteínas importantes para as funções celulares, como o reparo ao DNA. Essa classe de enzimas é, portanto, importante para a manutenção da integridade do genoma celular e como resultado desempenha um papel importante na susceptibilidade ao câncer^{59,60,61}.

Acredita-se que os prováveis mecanismos clássicos genotóxicos após a exposição aos compostos do tabaco constituem: formação de adutos de DNA, com consequente codificação errada, alterações na expressão de genes por meio da hipermetilação e instabilidade genômica^{52,55,59}.

Diversos estudos demonstraram correlação positiva entre o tabagismo e o desenvolvimento de câncer de pulmão em indivíduos que possuem o genótipo GSTM-1 nulo. Alguns destes trabalhos mostram associação entre a ausência deste gene e o aumento do número de adutos no DNA, além de uma deficiência na detoxificação de carcinógenos presentes no tabaco^{57,59,61,62}.

Por outro lado, recentemente, um grupo de 30 cientistas, provenientes de 10 países reuniram-se na IARC para reavaliar a carcinogenicidade do tabaco, identificar os mecanismo dessa carcinogênese e outras localizações adicionais de tumores associados ao tabagismo. Dentre outras avaliações e conclusões, os pesquisadores atentaram aos estudos de possíveis associações entre o polimorfismo de genes envolvidos no metabolismo de carcinógenos do tabaco e o risco para câncer e concluíram que a maioria apresenta resultados ambíguos, com possível exceção de NAT2 (enzimas de biotransformação) presentes em câncer de bexiga e de mama e GSTM-1 em câncer de pulmão^{57,59}.

Adicionalmente, Duarte et al.⁵⁵ (2008) investigaram a presença combinada e isolada das enzimas GSTM-1 e as enzimas do citocromo P-450 no desenvolvimento de leucoplasia oral e observaram que a deleção de GSTM-1 foi associada com o aumento do risco de desenvolvimento da mesma (*odds ratio* 4.36). Significa que o desenvolvimento de leucoplasia tem uma chance 4.36 vezes maior em pacientes que possuem deleção no gene GSTM-1. Desta forma, os autores concluíram haver associação positiva entre a presença isolada ou combinada do genótipo de GSTM1 e o desenvolvimento de leucoplasia.

2.3 Fatores de transcrição

Transcrição, em linha geral, é o processo de transferência da informação genética do DNA para a síntese de proteína, e fatores de transcrição são proteínas intracelulares que se ligam ao DNA desencadeando diversos eventos celulares.⁶³

Assim sendo, o controle da expressão gênica se dá ao nível da transcrição, onde os genes podem ser regulados em resposta a um sinal específico. Por exemplo: após a ligação de um agente estimulatório à superfície celular, o sinal é transmitido para o citoplasma, o que pode resultar numa resposta curta, ou ainda este sinal pode ser transmitido para o núcleo, onde ocorre a indução rápida de genes denominados imediatamente precoces e/ou a modificação de seus produtos proteicos.⁶³

Estes produtos protéicos irão regular tanto os genes alvos, como outros genes imediatamente precoces, ou genes cujo produto protéico exerce função no citoplasma ou na membrana celular. O resultado final causa resposta em longo prazo como proliferação ou diferenciação celular.⁶³

2.3.1 Fator de transcrição AP1

O fator de transcrição AP1 é constituído pelas famílias das proteínas Jun (c-Jun, JunB e JunD) e Fos (c-Fos, FosB, Fra1 e Fra2). As diferentes proteínas formam jun-jun e jun-fos homo e heterodímeros que se ligam ao DNA, na região denominada sítio de união do AP1, também conhecida como elemento de resposta TPA (12-O-tetradecanophorbol-13-acetato) TER, baseado na habilidade de mediar a indução transcricional em resposta ao tratamento com o promotor de tumor phorbol éster (TPA).⁶⁴⁻⁶⁶

As proteínas constituintes do fator AP1 são distinguidas estruturalmente por um domínio básico de zíper de leucina. É por meio desses domínios que as proteínas de AP1 dimerizam (ligam-se) e se conectam ao DNA. (Figura 2.2). O fator AP1 também dimeriza eficientemente com outros fatores de transcrição, incluindo aqueles que não pertencem à família zíper de leucina. Os dímeros de AP1 regulam

os genes alvos “downstream”, ou seja, que se situam abaixo, na via de sinalização, por meio da interação com o DNA na sequência 5' TGAGCTC A 3' reconhecida como TRE, presente na região de diversos genes humanos e virais.^{65,67}

Esta ligação do fator AP1 ao DNA, na sequência TER, ocorre por meio da indução de fatores de crescimento, citocinas, phorbol éster e oncoproteínas, implicados na proliferação de queratinócitos, apoptose, diferenciação, sobrevivência, tumorigenesis, angiogênese, invasão e metástase. Essas funções, ora antagônicas, são atribuídas à heterogeneidade na composição, tipo de tecido e contexto.⁶⁶⁻⁷⁰

Além disso, está claro que um único fator pode regular por fosforilação, tanto positivo quanto negativamente e que esses efeitos podem ser exercidos, tanto sobre a atividade de ligação ao DNA, quanto sobre a função de transativação. O melhor exemplo é a c-Jun, que será citada na sequência, onde a fosforilação em sítios de ligação ao DNA, regula negativamente, enquanto que a fosforilação em resíduos Ser-63, Ser-73, aumenta a atividade de transativação (o mesmo que atividade de transcrição).^{65,67,71}

A super-família AP1 é conhecida por modular a expressão de um conjunto de genes durante o desenvolvimento de muitos cânceres, sendo assim um importante alvo para a terapêutica moderna. Entretanto, este papel durante o desenvolvimento da carcinogênese oral humana ainda é pouco compreendido, o que torna interessante investigar o padrão e expressão geral de AP-1 na tumorigênese oral.^{66,72-79}

Trabalhos realizados com modelo animal revelam que a exposição ao tabaco por um longo período ativa AP1 em cérebro de camundongo. Enquanto que FOS e JUN são super regulados em ratos e linhagens celulares de hamsters, durante a exposição crônica de asbestos.⁷¹

Zhong et al.⁷² (2005) investigaram, em modelo experimental induzido, o efeito do tabaco no desenvolvimento de hiperplasia epitelial e metaplasia escamosa, na regulação da ativação da via MAPK/AP1, regulação das proteínas do ciclo celular e como marcadores de diferenciação em língua de ratos. A exposição ao tabaco (30mg/m³ ou 80 mg/ m³ por 3,6 horas durante 3 dias por semana, por 14 semanas), induziu dramaticamente a proliferação celular e metaplasia escamosa em dose dependente, efeitos que acompanharam a ativação da atividade de ligação do AP1 ao DNA. Os autores sugerem importante papel da via MAPK/AP1, induzida pelo tabaco na carcinogênese.

Esses dados reafirmam a importância de estudos entre a associação do tabaco e a expressão de Jun na carcinogênese bucal.

2.3.2 c-Jun

Jun foi originalmente isolada a partir do vírus do sarcoma de aves 17 (ASV17: abrev. de avian sarcoma vírus 17). A sigla c-Jun corresponde à versão celular da forma oncogênica viral v-Jun.⁷³

2.3.3 Estrutura da proteína

JUN está localizada no cromossomo 1 (1p32-p31) e resulta na expressão protéica constituída por 334 aminoácidos, composta por quatro domínios, os quais estão envolvidos na ligação ao DNA, transcrição e dimerização. Conforme indicado na figura 2.2.^{66,77}

A análise da estrutura da proteína Jun mostra que esta é constituída pela presença de quatro domínios. O domínio δ (laranja), o domínio de transativação (onde potencializa a expressão gênica) em amarelo, o domínio básico (ligação ao DNA) em azul, e o zíper de leucina em roxo.^{66,67}

Figura 2.2. Estrutura da proteína c-Jun (Reproduzido de Lopez- Bergami⁶⁶, 2010)
A, acetilação; dP defosforilação; P fosforilação, S simulação

2.3.4 Função e regulação da proteína

A proteína c-Jun é o componente predominante do fator AP1. Esta faz parte de uma classe de genes denominados “genes de expressão imediata” (*immediate-early genes*), e é ativada em resposta a estímulos mitogênicos, como danos ao DNA e stress. Funcionalmente, é reconhecida, primeiramente, por estar envolvida na atividade de proliferação celular. Consequentemente, seu bloqueio inibe a proliferação celular e também induz à apoptose, uma propriedade que Jun compartilha com outras oncoproteínas como Myc, E1A ou E2F. Além disso, atualmente acredita-se que a ativação de c-Jun é uma contribuição crucial para transformação na tumorigênese, mais do que um efeito indireto da oncogênese.⁶⁵⁻⁶⁷

Jun é regulada por modificações pós-transducionais, que são amplamente controladas por meio dos componentes da família MAPKs de serina e treonina quinase, incluindo a quinase reguladora de sinal extracelular (ERK1/2), a Jun quinase de N-terminal (JNK) e isoformas de p38. A transcrição de Jun também é induzida por SP1, fator nuclear-kB (NF-kB), fatores do complexo ternário (TCFs), MEF2 ou CCAAT-fatores de transcrição de ligação.⁷⁸

2.3.5 Ativação de c-Jun

Hunter e Karin⁶⁹ (1992) hipotetizaram que o fator de transcrição encontra-se no citoplasma, predominantemente na forma não fosforilada, devido à falta de acesso às suas sequências alvo. A fosforilação do fator ou uma ancoragem proteica citoplasmática, permitem sua translocação para o núcleo, onde o mesmo age. Os autores observaram que c-Jun está presente em células não estimuladas na forma oculta, ou seja, fosforilada nos sítios de inibição da ligação ao DNA. Em resposta a estímulos oncogênico, fator de crescimento, etc, c-Jun sofre defosforilação desses sítios e sua atividade de ligação ao DNA aumenta.^{69,71}

c-Jun é fosforilada em cinco regiões principais. Dois deles são regiões mitogênicas, localizadas dentro da região N-terminal do domínio de ativação. Corresponde a fosforilação nos resíduos Ser-63, Ser-73 e, por conseguinte, ocorre aumento de sua estabilidade e potencial de transativação.^{66,69}

As três outras regiões correspondem a fosforilação em células não estimuladas nos resíduos Thr-231, Ser-243 e Ser-249, localizadas imediatamente ao lado da região N-terminal do domínio de ativação. A fosforilação pela GSK3 nestes resíduos inibe a ligação ao DNA.^{69,67,71}

Alternativamente, JNK também fosforila no resíduo Thr91 e Thr93, que é necessário para ligar-se ao DNA e ativar sua atividade transcricional.⁶⁶

Assim como, c-Jun pode ser ativado após sua defosforilação pela enzima Jun fosfatase que é ativada por meio de TPA ou outros estímulos PKC. A remoção de fosfato (P) de resíduo localizado próximo à região de ligação ao DNA, permite a ligação de c-Jun com outras proteínas bZIP no sítio AP1.⁶⁴

Em resumo: A fosforilação de c-Jun, nos sítios de Ser-63/73 ou Thr91/Thr93, mediada por JNK, estimula a atividade de transcrição, enquanto que a fosforilação de c-Jun, nos sítios em Thr-231, Ser-243, Ser-249, mediada por GSK3, inibe a ligação ao DNA.⁶⁹

2.3.6 Mecanismo de degradação de Jun

Diversos mecanismos limitam a estabilidade de c-Jun. Esta exibe uma rápida regulação, na qual estimula eficazmente a transcrição de genes importantes para a entrada na fase G1 e S do ciclo celular, como a ciclina D1.⁷⁶⁻⁷⁹

A fosforilação de c-Jun nos resíduos Thr239 por GSK3 resulta na degradação proteossômica dependente de ubiquitinação (marcação de proteína indesejada para degradação).⁶⁶

A inativação de GSK3, devido à ativação de ERK e PI3K-AKT, resulta numa cascata de sinalização para estabilizar c-Jun. O efeito de GSK3 pode ser antagonizado por meio da defosforilação no resíduo ser243, mediado pela calcinerina. Com isso, não ocorre degradação de c-Jun⁶⁶. Figura 2.2

2.3.7 c-Jun em neoplasias

Foi observado em estudos de cânceres de pulmão, primários e metastáticos, além de áreas displásicas, positividade de c-Jun em 31% dos cânceres primários e metastáticos, enquanto que em áreas de epitélio alveolar normal, esta marcação foi negativa. Por meio desses resultados os autores sugeriram que a proteína c-Jun estava alterada nos eventos iniciais da carcinogênese do pulmão.⁶⁷

Diversas evidências sugerem que as proteínas c-Jun e outras AP1 coordenam programas de expressão de multigenes, requisitados em comportamentos de invasão e metástase⁶⁶. Na angiogênese JUN ativado é predominantemente encontrado na frente de invasão de tumores e está associado à multiplicação celular, à densidade dos microvasos e ao fator de crescimento endotelial.⁷⁹

Recentemente, um grupo de pesquisadores nos EUA, Swenson et al.⁸⁰(2011) utilizando linhagens celulares de queratinócitos premalignos infectados pelo HPV e de queratinócitos, obtidos de cultura primária de tumor primário de carcinoma epidermoide de laringe, através de técnicas como Elisa e Western blotting demonstraram que os carcinógenos presentes na fumaça de cigarro condensado

(FCC) podem influenciar significativamente a ativação de AP1 dependente de interleucina (IL-8) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Estas linhagens celulares foram transfectadas com o plasmídeo AP1, IL-8 e VEGF e o dominante negativo AP1 (A-Fos), que compete pela ligação ao DNA inibindo AP1. Os autores observaram que o FCC aumentou significativamente a atividade de AP1, IL-8 e VEGF em dose dependentes em ambas as linhagens celulares. Por outro lado, a adição do dominante negativo (A-Fos) diminui significativamente a atividade de AP1, IL-8 e VEGF em resposta ao tratamento de FCC. Já nas linhagens de queratinócitos premalignos infectadas pelo HPV, houve maior atividade de AP1, tanto na presença quanto na ausência dos carcinógenos presentes na fumaça de cigarro condensado. Os autores sugerem que HPV e FCC possam atuar sinergicamente na transformação maligna.

Outros estudos relatam que a exposição ao tabaco induz a ativação de AP-1 e MAPK em câncer de pulmão observando-se aumento na expressão de AP1. Os autores salientam que o tabaco apresenta importante papel na carcinogênese por meio da via MAPK/AP1.⁷⁶

Sousa et al¹⁹ (2002) demonstraram que c-Jun estava expressa em mucosa normal e em carcinoma epidermoide (CEC). Em condições de normalidade, c-Jun foi detectada no citoplasma das células das camadas epiteliais superiores, enquanto que no carcinoma epidermoide foi detectada no núcleo das células do tumor. Os autores concluíram que a expressão nuclear de c-Jun em CEC, em contraste à sua expressão citoplasmática em mucosa normal, indica que c-Jun pode ter papel no desenvolvimento do câncer.

Outro estudo realizado por Turatti et al.²⁰ (2005) observou que a expressão de c-Jun encontrava-se aumentada de acordo com o grau de displasia, com a maior expressividade em CEC. Esses resultados foram interpretados como possível papel de c-Jun na transformação maligna da mucosa oral.

Apesar do papel de c-Jun no ciclo celular estar bem elucidado e o seu papel no desenvolvimento em diversos tipos de câncer ser bastante investigado (Tabela 2), o entendimento dos mecanismos envolvidos na carcinogênese oral ainda permanece incipiente. Foi sugerido que essas alterações possam ser indicativas do envolvimento de c-Jun na carcinogênese oral.^{19,20,66,72-81}

Tabela 2.2 Desregulação dos membros da família JUN no câncer

Observação	Tipo de Tumor	Método
Amplificação de JUN e Superexpressão de JUN	Lipossarcoma	CGH, FisH, PCr e WB
Aumento na expressão de JUN	Câncer de pulmão	IHC
	Carcinoma epidermóide oral	IHC
	Neoplasia colorretal	IHC
	Câncer de pâncreas	IHC
	Leucemia mieloide aguda	Microarray
Aumento de níveis de JUN Fosforilada	Osteossarcoma	IHC
	Melanoma	WB
	Câncer de mama	IHC
Super-expressão de JUN e FOS	Câncer de próstata	TMA
Super-expressão de JUN e JUND	Câncer de mama	TMA
Super-expressão de JUN B	Linfoma CD 30 ⁺	TMA e IHC
Super-expressão de JUND e JUN	Linfoma primário cutâneo de células B	IHC
Super-expressão da atividade de AP1	Adenocarcinoma colorretal	IHC e WB
Aumento da atividade de AP1 (FOS-JUNB)	Câncer de endométrio	WB
	Câncer cervical	WB

CGH- hibridização genômica comparativa, eMsA- ensaio de mobilidade eletroforética, FisH, hibridização in situ fluorescência; IHC, imunohistoquímica; TMA, microarray; WB, western blot (Adaptado de Lopez-Bergami,⁶⁶ 2010)

2.3.9 c-Jun fosforilada (p-c-Jun)

A ativação de c-Jun tem sido encontrada numa variedade de tumores humanos que incluem câncer de fígado, pulmão, endométrio, cabeça e pescoço, pâncreas e mama. Seu alto nível de expressão ou ativação é associado com pior prognóstico em câncer de mama, endométrio e pâncreas e carcinoma epidermoide.

82-85

Kuo et al.⁸² (2006) investigaram o possível papel de p-c-Jun em carcinoma epidermoide oral relacionado ao hábito de mascar noz de areca. Por meio da análise estatística (Curva de Kaplan-Meier), os autores observaram que a positividade de p-c-Jun em carcinoma epidermoide e em metástases linfonodais teve pior prognóstico ($p < 0.0018$ e 0.001 respectivamente).

Papachristou et al.⁸³ (2006) avaliaram a associação entre os níveis das proteínas JNK (JNK1 e JNK2) e suas formas fosforiladas, pJNK, e também seu substrato c-Jun e sua forma fosforilada/ativada (p-c-Jun) na patogênese e progressão de osteossarcoma em humanos. O nível celular de cada proteína foi significativamente correlacionado entre si ($p < 0.001$ para cada correlação). Além disso, os níveis de expressão de todas as proteínas foram detectadas significativamente em tumores de alto grau em comparação com os de baixo grau. Quando os níveis celulares dos componentes da via de sinalização de JNK e c-Fos foram avaliados como possíveis marcadores biológicos de graduação tumoral, altos níveis de expressão de c-Jun e abundância de pc-Jun predisseram um alto grau tumoral. Estes achados provaram uma nova evidência de que a via de sinalização de JNK é funcionalmente operante na transformação maligna de osteoblastos e subsequente ao desenvolvimento e progressão do osteossarcoma humano. Os autores concluem que a avaliação da expressão de c-Jun e a ativação dependente de JNK pode facilitar uma melhor previsão de comportamento clínico do tumor e, ao mesmo tempo, explorar medidas para conduta terapêutica que o paciente deverá se submeter.

O trabalho de Gee et al.⁸⁴ (2000) examinou o impacto da ativação de p-c-Jun numa série de parâmetros clínicos e biológicos em câncer de mama. Este trabalho identificou associação significativa entre a proteína c-Jun fosforilada e a expressão de diversos elementos, tais como a via de sinalização da quinase erbB/MAP, TGF α

e EGFR. Assim como, correlações diretas com a ativação de MAPK e JNK. Os autores argumentam que é provável que haja uma atividade considerável de AP-1 dentro da via de sinalização de c-Jun em câncer de mama humano, bem como inativadores específicos de AP-1. Além disso, pode haver influências negativas da fosforilação em locais adicionais na proteína c-jun (ex: serina 243/249 e treonine 230/239).

2.4. Relembrando as fases do ciclo

O ciclo celular é dividido didaticamente em 4 fases: G1, S, G2 e M, correspondendo à MITOSE propriamente dita.⁶³

A fase G1 corresponde ao período no qual as células se preparam para o processo de replicação do DNA, onde ocorre síntese intensa de proteínas necessárias para a fase seguinte. Na fase S ocorre a síntese do DNA. A próxima fase G2 corresponde ao processo de divisão celular completado na fase M, que corresponde à prófase, metáfase, anáfase e telófase culminando com a separação dos dois cromossomos em duas células filhas. A fase G0 corresponde a um estado quiescente. Nesse estágio as células permanecem metabolicamente ativas, porém não se multiplicam. Quando estimuladas por sinais extracelulares ou intracelulares voltam à fase G1 e continuam o ciclo.⁶³

Para que ocorra a progressão do ciclo celular, necessita-se de uma ativação sequencial rigorosamente orquestrada pela família de proteínas quinases dependentes de ciclina (CDKs). A atividade deste complexo CDK é regulada por meio do acúmulo de ciclinas, fosforilação/defosforilação e pelas proteínas inibidoras das ciclinas (CKIs), tais como p27.⁸⁶

As CKIs são frequentemente associadas com doenças quando mutadas ou desreguladas. A proteína p27 se liga a vários complexos ciclina/CDK ao longo do ciclo celular, é um inibidor de CDK exemplar cuja desregulação, e não uma mutação genética, é encontrado em diversos tipos de câncer.⁸⁶

2.4.1 p 27

A proteína p27 foi primeiramente identificada como inibidora do complexo da ciclina E/CDK2 durante a inibição da fase G1 induzida pela TGF- β .⁸⁶

2.4.2 Função e regulação de p27

A atuação de p27 pode ser induzida através de sinais extracelulares, quando estímulos como perda de adesão celular à matriz extracelular, fator de crescimento transformante-beta (TGF-B), dano no DNA, presença de AMP cíclico, drogas inibitórias como rampamicina, contato celular inibitório estiverem presentes. Estes fatores atuam aumentando a atividade de p27, por conseguinte inibem as CDKs bloqueando o ciclo não só na fase G1, mas em qualquer uma das fases.⁸⁶⁻⁹⁰

Sendo assim, a proteína p27 desempenha um papel fundamental em processos celulares como proliferação, diferenciação, apoptose e adesão. Já no citoplasma, promove remodelamento do citoesqueleto e pode influenciar positivamente a metastatização.^{86,87}

A atividade de p27 depende dos níveis da proteína que são regulados, principalmente, por meio da degradação dependente de proteasoma e/ou do controle transcricional. A função inibitória está fortemente associada a sua localização nuclear atuando como uma proteína antiproliferativa.^{86,87}

Os níveis de p27 apresentam-se maiores nas células em estado quiescente quando comparados às células proliferativas. Esta proteína é regulada através da fosforilação em diversos sítios. A forma não fosforilada, atua como inibidora de ciclina, enquanto que a forma fosforilada pode apresentar várias funções de acordo com o sítio de fosforilação.⁸⁶

Alguns estudos informaram que a proteína p27 se remodela através de fosforilação e conseqüentemente altera suas parcerias proteicas, modificando suas funções celulares, localização assim como, seus níveis de expressão.⁸⁶

A ciclina E/CDK2 fosforila p27 no sítio Thr187 e conduz para sua degradação ubiquitina dependente.⁹⁰

A p27 é também fosforilada pela AKT no sítio Thr157 e Thr198, permitindo, dessa forma, uma montagem mais eficaz dos complexos de D/CDK4, e esta ligação de p27 com a ciclina D/CDK4 facilita a ativação da ciclina E/CDK2, através do seqüestro da proteína inibidora⁸⁵. Portanto, a ligação diferenciada de p27 às distintas CDks durante a fase G1 do ciclo celular pode ser atribuída ao status de fosforilação da p27.⁸⁶⁻⁹⁰

Como a fosforilação de p27 é ciclo celular dependente, a atividade inibidora da p27 pela ciclina E/CDK1 atinge seu ponto máximo durante a G0 e cai quando as células vão de G1 para a fase S. Ao mesmo tempo, a ligação da ciclina D/CDK4 à p27 é máxima na fase inicial de G1.⁸⁶

Todas estas descobertas sugerem que a sinalização antimitogênica, que pode alterar o status de fosforilação da p27, pode mudar a ligação de p27 ao complexo CDK4/6 para o complexo de E/CDK2, restabelecendo o controle do ciclo celular.⁸⁶

Num estudo de revisão conduzido por Lee e Kim⁸⁶ (2009) os autores chegaram à conclusão que muitos trabalhos clínicos acabaram por beneficiar o entendimento de que a proteína p27 possa ser um indicador de prognóstico para câncer de: cólon, mama, próstata, pulmão, esôfago e gástrico. Isso é respaldado no fato de que a atividade tumorigênica de p27 é dependente de sua quantidade, ou seja, menores quantidades desta proteína estão associadas ao aumento da malignidade. Além disso, agora é entendido que a desregulação de p27, não a perda do seu gene, é a causa da redução de níveis da mesma. Portanto, uma melhor compreensão dos mecanismos de regulação de p27 pode fornecer um valor clínico de grande valia com aplicações de prognóstico e conduta terapêutica. Os autores relatam que esta fascinante proteína tem chamado a atenção de médicos e cientistas, e como resultado, a compreensão das funções e mecanismos celulares estão constantemente sob investigação.

2.4.3 Expressão de p27 em leucoplasia

Jordan et al.⁹¹ (1998) examinaram a expressão de p27, ki-67, ciclina A, por imunohistoquímica em 10 casos de fragmento de epitélio normal, 36 displásicos e em 8 de cec de localização exclusiva em assoalho bucal. P27 apresentou-se significativamente reduzida em displasias de baixo e alto risco quando comparada com o epitélio normal. Este estudo revelou que a expressão diminuída de p27 está associada à displasia e carcinoma em assoalho bucal, bem como associada discretamente com o aumento de ki-67 e ciclina A. Frente a isso, os autores afirmam que a proteína p27 contribui na desregulação da cinética celular durante a carcinogênese neste local.

Saito et al.⁹² (1999) investigaram a expressão de p27, ciclina D1, PCNA, utilizando marcação imunohistoquímica para esclarecer a relação destas proteínas com o ciclo celular e índice apoptótico em leucoplasia. Os autores sugerem que a abundância de p27 em leucoplasia oral pode inibir a proliferação celular e conduzir as células tumorais pré-malignas à apoptose, e, portanto, ir de encontro com a prevenção de progressão do tumor.

Kosevi et al.⁹³ (2006) estudaram o valor prognóstico de p27 em leucoplasia. O índice de p27 foi de 14-16% em leucoplasia homogênea e nodular, porém foi substancialmente inferior a 1-2% em eritroleucoplasia. Os autores concluem que a expressão característica de p27, em diferentes formas de leucoplasia pode ter um valor de prognóstico.

Ribeiro et al.⁹⁴ (2012) investigaram a imunoexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), em amostra de leucoplasia para determinar a associação do receptor, com a displasia, o consumo de tabaco, local da lesão, e a taxa de proliferação. Foi realizado juntamente a imuno-detecção de ki-67 e p27. Língua e assoalho foram considerados localizações de alto risco. O índice de p27 foi menor na camada parabasal na presença de displasia. Os autores finalizam que a associação entre o EGFR e p27 pode representar um mecanismo importante no controle da proliferação celular e na progressão maligna do epitélio oral.

2.4.4 c-Jun e p27

Alguns trabalhos descritos na literatura analisaram o papel da c-Jun e p27 e observaram uma correlação inversa entre essas duas proteínas.^{77,85} Li et al⁸⁵ (2007) estudando a atuação da proteína c-Jun na proliferação de células epiteliais prostáticas, através de cultura celular, demonstrou que a proteína c-Jun secreta nos fibroblastos elevados níveis de IGF-1 e estimula a hiperplasia prostática benigna. Adicionalmente, a indução do fator de crescimento dependente de insulina (IGF-1) ativa a via de sinalização do AKT, da MAPk e a produção de ciclina D1. Os autores observaram baixos níveis de p27 e expressão aumentada de c-Jun na presença do fator de crescimento dependente de insulina (IGF-1). Sugeriu-se que o gene p27 é um dos principais alvos do mecanismo de regulação de c-Jun na proliferação celular.

Em outro trabalho foi observada uma relação inversa entre as expressões de p27 e c-Jun em linfomas de grandes células, por meio da técnica de *Western Blotting*. Enquanto a proteína c-Jun se apresentava super expressa, a p27 era subexpressa. Os autores consideram que c-Jun possa ter participação na degradação de p27 e com isso a progressão do ciclo celular.⁸⁵

2.5 Justificativa deste estudo

Apesar do papel do tabaco na etiologia da leucoplasia ser aceito na literatura, não existem resultados consensuais sobre seu exato papel na tumorigênese. Além disso, os aspectos clínicos e histopatológicos não são suficientes para prever quais lesões irão malignizar. Desta forma, a identificação de marcadores moleculares pode ser útil em prever quais lesões irão evoluir para o câncer oral, bem como contribuir para o monitoramento dos pacientes de risco.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral

Analisar a associação da expressão imunohistoquímica de c-Jun, p-c-Jun e p27 em leucoplasias orais com e sem displasia epitelial, provenientes de pacientes fumantes e não fumantes com as variáveis clinicopatológicas.

3.2 Objetivos específicos

- Quantificar a distribuição (em porcentagem) de células positivas para c-Jun, p-c-Jun e p27.
- Verificar se há associação da imunomarcagem com a localização e gênero.

4 CASUÍSTICA-MATERIAS E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP, sob Protocolo de número 184/2010 (Anexo A).

4.1 Casuística

Do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP foram selecionados casos de lesões bucais diagnosticadas clinicamente como leucoplasias e histopatologicamente apresentavam tanto a presença como a ausência de displasia.

As lesões foram separadas em provenientes de pacientes fumantes e não fumantes em um total de 20 lesões para cada grupo, perfazendo um total de 73 casos. Sete casos foram retirados das amostras, devido a não marcação dos três anticorpos. As informações clínicas sobre: sexo, raça, idade, duração, tamanho e localização da lesão, hipótese diagnóstica, procedência e hábitos do pacientes foram obtidas a partir dos dados contidos nas fichas dos pacientes, no momento da biópsia e do pedido do exame anatomopatológico. Os 73 casos foram divididos da seguinte forma:

Grupo 1- Leucoplasia com ausência de displasia epitelial - fumante

Grupo 2- Leucoplasia com ausência de displasia epitelial - não fumante

Grupo 3- Leucoplasia com presença de displasia epitelial - fumante

Grupo 4- Leucoplasia com presença de displasia epitelial - não fumante

4.2 Análise histopatológica, graduação de displasia

Os critérios de análise histopatológica seguiram a classificação recente de displasia sugerida por pesquisadores da OMS do Centro de Câncer e Pré-Câncer Oral que consiste em um sistema binário, baseado nos mesmos critérios morfológicos utilizado na classificação da OMS de 2005 (alterações arquiteturais e citológicas), que gradua as lesões em “alto risco” e “baixo risco”. As displasias são consideradas de “alto risco” quando envolvem quatro alterações arquiteturais e cinco alterações citológicas (descritos na tabela 4.1) e de “baixo risco” quando envolvem menos de quatro alterações arquiteturais e menos de cinco alterações citológicas (Tabela 4.1), com o propósito de prognosticar o risco de transformação maligna com maior eficiência.²⁵

Tabela 4.1 - Critérios estabelecidos pela OMS para classificação de displasia epitelial

Alterações arquiteturais	Alterações citológicas
1 Estratificação irregular do epitélio	1 Variação do tamanho do núcleo
2 Perda da polaridade da camada basal	2 Variação da forma do núcleo
3 Projeções em gota	3 Variação do tamanho celular
4 Pérolas de queratina	4 Variação da forma celular
5 Aumento do número de mitoses	5 Aumento do tamanho e forma do nucléolo
6 Mitoses anormais superficiais	6 Aumento da proporção núcleo/citoplasma
7 Queratinização precoce	7 Hiperchromatismo
	8 Figuras mitóticas atípicas
	9 Aumento do tamanho do núcleo

Adaptado de Kujan et al.²⁵(2006).

4.4 Critérios de inclusão

1. Biópsia com diagnóstico clínico de leucoplasia e diagnóstico histopatológico de hiperqueratose e/ou hiperplasia sem ou com displasia epitelial subdividida em baixo e alto risco.

2. Pacientes foram considerados fumantes e não fumantes segundo o modelo validado, proposto pela OMS para estudos de tabagismo entre profissionais da saúde.⁵⁰

- Fumante regular: consumidor de, no mínimo, um cigarro diário pelo menos nos últimos seis meses.
- Fumante pesado: consumidor de ≥ 20 cigarros por dia pelo menos nos últimos seis meses.
- Fumante ocasional: o que fumava menos que um cigarro diário ou, esporadicamente, por período não inferior a seis meses.
- Ex-fumante: indivíduo que abandonou o cigarro há pelo menos seis meses.
- Não fumante: o que não se encaixava em nenhum desses conceitos.

Este modelo foi adaptado devido à ausência de detalhamento de frequência em alguns casos da amostra (fumante ocasional, regular ou pesado). Foram considerados fumantes todos os pacientes consumidores de cigarros nos últimos seis meses e não fumantes, pacientes que nunca fumaram.

4.5 Critério de exclusão

1. Lesões cuja história clínica e localização eram indicativas de queratose benigna do rebordo alveolar²³
2. Lesões localizadas em lábio, já que pode coexistir com a queilite actínica.
3. Lesões com material insuficiente para análise anatomopatológica
4. Lesões com diagnóstico histológico específico

A confirmação do diagnóstico foi feita por meio de cortes histológicos corados pelo método da hematoxilina/eosina.

4.6 Técnica de imunohistoquímica

Do material previamente incluído em parafina, foram obtidos cortes de três µm que foram submetidos à técnica da estreptoavidina-biotina, para a detecção das proteínas c – jun, p-c-Jun e p27. Os cortes foram estendidos sobre lâminas de vidro, as quais foram previamente lavadas em álcool absoluto, secas e mergulhadas por dois minutos em solução de organossilano, novamente lavadas em água destilada e secas em estufa a 37°C por 24 horas. Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 15 minutos, o segundo à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida esses cortes foram reidratados em uma série descendente de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol a 95%, 90%, 85%, 80%, durante cinco minutos cada. Após essa reidratação, os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio a 10% durante 10 minutos, com a finalidade de remover o pigmento formólico. Após duas lavagens em água destilada, por cinco minutos cada, as lâminas receberam os tratamentos de recuperação antigênica, para que ocorra o restabelecimento dos sítios antigênicos e o rompimento das ligações cruzadas com o formol. O tratamento realizado para os anticorpos: c-jun, p-c-Jun e p27, foi a utilização de uma solução de ácido cítrico, pH 6,0 em banho termostaticado, por 30 minutos a 95°C. Após o tratamento, os cortes

foram novamente lavados em água destilada por 10 minutos seguidos do bloqueio da peroxidase endógena tecidual, onde os mesmos foram imersos em dois banhos de 15 minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio a 6% em metanol (V/V). Em seguida, os cortes foram novamente lavados em água destilada por cinco minutos, e posterior lavagem em solução tampão de TRIS pH 7,4 por mais cinco minutos. Em seguida foi feita a incubação do anticorpo primário c – jun, numa diluição de 1:200 em BSA (clone H-79, Santa Cruz Biotechnology) durante 2 horas, do anticorpo p-c-Jun, numa diluição 1:100 em BSA (clone KM-1 Santa Cruz Biotechnology) e do anticorpo p27+ BSA, diluído a 1:100 (clone SX53G8, Dako Corporation), ambos durante 2 horas. Em seguida, foi realizada lavagem em solução tampão TRIS pH 7,6 por cinco minutos(3 banhos) e posterior incubação com o kit Envision (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos. Em seguida foi realizada a lavagem em TBST pH 7,6 (3 banhos).

Para revelação foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina 0, 025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co, St Louis MO / USA). Após posterior lavagem em água destilada, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer, previamente filtrada. O passo seguinte foi a desidratação em cadeia ascendente de etanol, seguindo a seqüência de 70%, 90% e 100% durante 2 minutos em cada banho, e posterior diafanização em xilol (dois banhos de 5 minutos cada). As lâminas de vidro foram então montadas com lamínulas de vidro e com Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Como controle negativo houve a omissão do anticorpo primário. Como controle positivo foi utilizado um caso de carcinoma epidermóide de boca, sabidamente positivo para estes anticorpos.

4.7 Quantificação de células para os marcadores analisados

A análise das reações de imunohistoquímica foi feita por meio da contagem das células que apresentavam positividade nuclear, as quais foram contadas manualmente - 500 células por campo, escolhidas em função da maior marcação. Em cada campo foram contabilizadas tanto as células positivas como as negativas. Foram consideradas positivas as células com marcação nuclear acastanhada e

negativa as células com marcação citoplasmática ou com ausência de marcação. As imagens foram obtidas em microscópio de luz com aumento final de 400 vezes, sob um foco fixo com clareza de campo, para que pudesse ser distinguido bem o citoplasma e núcleo.

Em seguida as imagens foram transferidas para um monitor acoplado a um sistema computadorizado e visualizadas por meio do software AxioVision.

4.8 Comparações entre os grupo

A análise imunohistoquímica com positividade nuclear para as proteínas c-Jun, p-c-Jun e p27 foi realizada através dos cruzamentos das seguintes variáveis:

1. Imunomarcção positiva para c-Jun, p-c-Jun e p27 entre as lesões displásicas e não displásicas de acordo com o hábito de tabagismo.
2. Imunomarcção positiva para c-Jun, p-c-Jun e p27 entre as lesões displásicas e não displásicas de acordo com o hábito de tabagismo e gênero.
3. Imunomarcção positiva para c-Jun, p-c-Jun e p27 entre as lesões displásicas e não displásicas de acordo com o hábito de tabagismo e localização anatômica.

4.9 Análise estatística

Os dados categóricos foram submetidos ao teste do Qui-quadrado, Exato de Fisher e teste Binomial de duas proporções, para verificar se havia associação significativa entre as variáveis. O nível de significância foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Casuística

As amostras deste estudo consistiram em 62 pacientes sendo 32 homens e 30 mulheres. Não foram excluídos das amostras casos múltiplos pertencentes a um mesmo paciente, por apresentarem-se em localizações e diagnósticos diferentes, assim como as características peculiares da lesão, ser difusa, multifocal e exibir grande variação morfológica.

Ao final, as amostras consistiram em 73 casos diagnosticados como leucoplasia, dos quais 44 casos corresponderam a lesões displásicas (24 fumantes e 20 não fumantes), e 29 casos de lesões não displásicas (14 fumantes e 15 não fumantes). Esses dados estão demonstrados na Tabela 5.1.

A tabela 5.1 apresenta a frequência de lesões com presença ou ausência de displasia em pacientes fumantes e não fumantes. Observou-se que não houve diferença significativa ($p= 0.5430$) entre os pacientes fumantes e os não fumantes em lesões displásicas de acordo com a graduação de alto e baixo risco, porém notou-se maior frequência de lesões displásicas de alto risco em pacientes fumantes.

Tabela 5.1- Frequência de lesões displásicas e não displásicas, de acordo com o hábito de fumar

Lesões	Fumante (%)	Não fumante (%)	p	Total (%)
Displásicas	24(54.54)	20(45.45)		44 (100)
Alto risco	15(34.05)	10 (22.72)	0,5430	25 (56.82)
Baixo Rico	9(20.45)	10 (22.72)		19 (43.12)
Não-displásicas	14 (48.27)	15 (51.73)		29 (100)

Estatisticamente significativo quando $p > 0,05$

5.2 Morfologia

Os fragmentos corados pela técnica de Hematoxilina/Eosina (H/E) foram observados em microscópio de luz, por um patologista experiente, e graduados (a cego), segundo a classificação do sistema binário (Kujan et al.²⁵ 2006) em baixo e alto risco.

Na Figura 5.1 é possível observar um fragmento de mucosa removido de um paciente, com histórico de leucoplasia, entretanto sem a presença de displasia.

Figura 5.1- Observa-se ausência de displasia caracterizada pela presença de epitélio estratificado pavimentoso hiperqueratinizado, exibindo áreas de acantose e projeções epiteliais em direção ao tecido conjuntivo

Na Figura 5.2 é possível observar um fragmento de mucosa removido de paciente com histórico de leucoplasia, desta vez, apresentando áreas de displasia epitelial.

Figura 5.2- Observa-se displasia epitelial de alto risco, na qual se notam estratificação irregular, pleomorfismo celular e nuclear, hiperchromatismo, figuras de mitose (imagem cedida pelo Prof. Décio dos Santos Pinto Jr)

A tabela 5.2 mostra a distribuição de idade dos pacientes com leucoplasia. Observa-se que a idade mediana nos fumantes é menor do que nos pacientes não fumantes.

Tabela 5 2 - Mediana da idade (mínimo e máximo) de acordo com hábito de fumar em lesões displásicas e não displásicas

Lesões	Fumante (n=35)	Não fumante (n=33)	Total (n=68)
Displásicas	55(43-82)	62 (38-89)	41
Não-displásicas	49(28-73)	53.5(40-85)	27

A tabela 5.3 contém a descrição de lesões displásicas ou não, de acordo com o hábito de fumar em relação ao gênero. Observou-se maior frequência de lesões displásicas em homens fumantes e mulheres não fumantes.

Tabela 5.3 - Frequência de lesões displásicas e não displásicas de acordo com hábito de fumar e gênero

Lesões	Fumante (n=38)			Não fumante (n=35)			Total (%)
	Displásicas (%)	Não displásicas (%)	p	Displásicas	Não displásicas (%)	p	
Feminino	9 (12.32)	5 (6.84)	0,5970	12 (16.43)	10 (13.69)	0,7372	36 (49.31)
Masculino	15 (20.54)	9 (12.32)		8 (10.95)	5 (6.84)		37 (50.69)
Total	24 (32.87)	14 (19.17)		20 (27.39)	15 (20.54)		73(100%)

Estatisticamente significativo quando $p > 0,05$

A tabela a seguir apresenta a distribuição de sítios anatômicos diagnosticados com leucoplasia. Conforme mostra a tabela 5.4, observa-se maior ocorrência de lesões displásicas em regiões de língua e assoalho bucal independente da condição fumante do paciente.

Tabela 5.4 - Frequência de lesões displásicas e não displásicas de acordo com hábito de fumar e localização

Localização	Fumantes (n=36)		Não fumante (n=34)		Total n=70(%)
	Displásicas (%)	Não displásicas (%)	Displásicas (%)	Não displásicas (%)	
Assoalho bucal	3(4.1)	0	8 (10.95)	0	11(15.06)
Língua	8(10.95)	1(1.36)	6(8.21)	1(1.36)	16(21.91)
Palato	4(5.47)	1(1.36)	0	1(1.36)	6(8.21)
Mucosa jugal	2(2.73)	2(2.73)	3(4.1)	2(2.73)	9 (12.32)
Gengiva	1(1.36)	3(4.1)	3(4.1)	3(4.1)	10(13.69)
Outros localizações	5(6.84)	6(8.21)	0	7(9.58)	18(24.65)
Sem dado	1(1.36)	1(1.36)	0	1(1.36)	3(4.1)
Total	24	14	20	15	70(100)

O tamanho da lesão, nas lesões displásicas e não displásicas, em pacientes fumantes ou não fumantes, está representado na tabela 5.5. Não foi observada diferença significativa ($p = 0.7790$) envolvendo os grupos analisados.

Tabela 5.5 - Mediana do tamanho-mm (mínimo e máximo) de acordo com hábito de fumar em lesões displásicas e não displásicas

Lesões	Fumante	Não fumante	p	Total
Displásicas	10 (0.5-40)	10(2-100)	0.7790	34 (56.66)
Não-displásicas	15 (4-60)	20(3-100)		25(43.44)

A duração da lesão não apresentou associação à presença de displasia. Esses dados estão mostrados na tabela 5.6.

Tabela 5.6 - Mediana do tempo de duração das lesões displásicas e não displásicas, em meses (mínimo e máximo), de acordo com hábito de fumar

Lesões	Fumante (23)	Não fumante (14)	Total n=37(%)
Displásicas	5(1-48)	9(3-48)	27(72.95)
Não-displásicas	6(1-24)	6(3-24)	10(27.05)

Figura 5.3-Representação imunohistoquímica do padrão de coloração de c-Jun, p-c-Jun e p27

- A. Imunomarcacão de c-Jun em displasia não fumantes. c-Jun apresenta marcação nuclear de coloração castanho claro e cor marrom intenso, em todas as camadas do epitélio.
- B. Imunomarcacão de p-c-Jun em displasia não fumantes. p-c-Jun apresenta marcação nuclear acastanhada intensa em todas as camadas do epiélio.
- C. Imunomarcacão de p27 em displasia não fumantes. p27 apresenta marcação nuclear de coloração padrão cor marrom intenso

5.3 Expressão imuno-histoquímica c-Jun, p-c-Jun e p27

A positividade nuclear para c-Jun e p-c-Jun foi avaliada pela imunomarcação de coloração marrom ou castanha nuclear nas camadas basal, parabasal e suprabasal. A imunomarcação para o p27 apresentou coloração acastanhada nas camadas parabasal e suprabasal (fotos).

Exemplos de marcação imunohistoquímica de c-Jun, p-c-Jun e p27 encontrados em casos representativos de lesões displásicas e não displásicas entre fumantes e não fumantes estão mostrados lado a lado nas figuras 5.4, 5.5, 5.6.

Figura 5.4 - Representação imunohistoquímica da expressão de c-Jun no total da amostra

- A) Positividade nuclear de c-Jun em LO com displasia epitelial alto risco em fumante (400X).
- B) Positividade nuclear de c-Jun em LO com displasia epitelial alto risco em não fumante (100X no original).
- C) Positividade nuclear de c-Jun em LO sem displasia epitelial em fumante (100X no original).
- D) Positividade nuclear de c-Jun em LO sem displasia epitelial em não fumante (100X no original)

Figura 5.5 - Representação imunohistoquímica da expressão de p-c-Jun no total da amostra

- A) Positividade nuclear de p c-Jun em LO com displasia epitelial alto risco em fumante (400X).
- B) Positividade nuclear de p-c-Jun em LO com displasia epitelial alto risco em não fumante (100X)
- C) Positividade nuclear de p-c-Jun em LO sem displasia epitelial em fumante (100X no original).
- D) Positividade nuclear de p-c-Jun em LO sem displasia epitelial em não fumante (100X no original)

Figura 5.6 - Representação imunohistoquímica da expressão de p-c-Jun no total da amostra

- A) Positividade nuclear de p27 em LO com displasia epitelial alto risco em fumante (400X).
- B) Positividade nuclear de p27 em LO com displasia epitelial alto risco em não fumante (100X).
- C) Positividade nuclear de p27 em LO sem displasia epitelial em fumante (100X no original).
- D) Positividade nuclear de p27 em LO sem displasia epitelial em não fumante (100X no original).

A tabela 5.7 apresenta a quantidade em percentual de células positivas para c-Jun de acordo com o padrão de marcação. Na comparação das lesões displásicas entre fumantes e não fumantes. Observou-se que a expressão de c-Jun independe da condição fumante do paciente.

Tabela 5.7- Imunopositividade para c-Jun de acordo com padrão de marcação

Marcação c-Jun	Fumante(38)		Não fumante(35)	
	Displásicas (%)	Não displásicas (%)	Displásicas(%)	Não Displásicas (%)
Ausente	2 (8)	5(35.7)	3(15)	5(35.7)
< 20%	6 (25)	3(21.4)	5(25)	4(26.66)
≥ 20% e < 50%	9(37.5)	5(35.7)	7(35)	3(20)
≥ 50%	7(29)	1(7.14)	5(25)	3(20)

No gráfico 5.1 estão representados 58 casos positivos para c-Jun, equivalente a 79.4 % do total da amostra, de acordo com o padrão de marcação, sem distinção de severidade para as lesões displásicas.

Gráfico 5.1- Representação gráfica da positividade ao c-Jun

A tabela 5.8 apresenta a quantidade em percentual de células positivas para p-c-Jun de acordo com padrão de marcação. Na comparação da amostra total observa-se que a marcação de p-c-Jun não difere entre os quatros grupos analisados ($p>0,05$).

Tabela 5.8 Imunopositividade para p-c-Jun de acordo com padrão de marcação

Marcação p-c-Jun	Fumante (38)		Não fumante(35)	
	Displásicas(%)	Não displásica(%)	Displásicas (%)	Não displásica(%)
Ausente	13(54.16)	7(58).	8(40)	3(21.42)
< 20%	3(12.5)	1(8)	5 (25)	9(64.28)
≥ 20% e < 50%	5(20.8)	4(34)	6(30)	1(7.14)
≥ 50%	1(4)	0	1(5)	1(7.14)

No gráfico 5.2 podemos visualizar o número de 37 casos positivos para p-c-Jun, equivalente a 50.7% da amostra, de acordo com padrão de marcação sem distinção de severidade.

Gráfico 5.2 Representação gráfica da positividade ao p-c-Jun

A tabela 5.9 apresenta a quantidade em percentual de células positivas para p27 de acordo com padrão de marcação. Comparando a baixa expressão de p27 - considerada de pior prognóstico, a qual se lê marcação discreta, nota-se maior quantidade de casos em lesões displásicas em relação às lesões não displásicas, independente do hábito de fumar do paciente.

Tabela 5.9 Número de casos positivos para p27 de acordo com padrão de marcação

Marcação p27	Fumante(38)		Não-fumante(35)	
	Displásicas(%)	Não-displásicas(%)	Displásicas(%)	Não displásicas(%)
Ausente	4(17.39)	0	2(10)	2(14.28)
< 20%	9(39.12)	7(50)	15(75)	6(42.8)
≥ 20% e < 50%	6(26.08)	4(20)	3(15)	4(42.8)
≥ 50%	4(17.40)	3(21)	0	2(14.28)

O gráfico 5.3 apresenta o número de 63 (86.3%) casos positivos para p27 , de acordo com o padrão de marcação independente da severidade.

Gráfico 5.3 Representação gráfica da positividade ao p27

5.3.4 Análise da positividade dos três anticorpos entre si

A variável expressão dos anticorpos foi dicotomizada para permitir a análise estatística como segue na tabela 5.10

Anticorpos anti-c-Jun e anti-p-c-Jun dicotomizados em: ausência ou marcação menor que 20% de células positivas, e marcação maior que 20% de células positivas, ambos em qualquer extrato do epitélio.

Anticorpos anti-p27 dicotomizados em: ausência ou marcação menor que 20% de células positivas, e marcação maior que 20% de células positivas, ambos em camada parabasal e suprabasal.

Comparando a marcação de c-Jun com p-c-Jun, no total das amostras e no grupo de lesões displásicas em fumantes, notou-se significativamente menor quantidade de casos positivos para p-c-Jun ($p = 0,0448$) (>20% células positivas). Conforme apresentado na tabela 5.10.

Tabela 5.10 - Imunomarcção de c-Jun, p-c-Jun e p27 na amostra total.

Positividade	c-Jun (n=68)	pc-Jun(n=53)	p27(n=68)
<20%	30	34	41
>20%	38*	19*	27

* Estatisticamente diferentes entre si ($p=0,0448$) – Teste Exato de Fischer.

Na Figura representada pelo gráfico 5.4 podemos observar a distribuição geral das marcações para os três anticorpos independente de apresentar displasia ou não, ou de ser fumante ou não.

Gráfico 5.4 - Imunomarcção de c-Jun, p-c-Jun e p27 na amostra geral

Comparando a marcação de c-Jun com p-c-Jun no grupo de lesões displásicas em fumantes, notou-se significativamente menor quantidade de casos positivos para p-c-Jun ($p = 0,0169$) (>20% células positivas). (Gráfico 5.4 e 5.5).

Na comparação da marcação de c-Jun e p27 em lesões displásicas em pacientes não fumantes, notou-se menor quantidade de casos positivos para p27 (>20%) $p=0,0079$. (Gráfico 5.5).

Gráfico 5.5 - Representação gráfica das frequências de casos com positividade >20% para os marcadores em lesões displásicas e não displásicas

A tabela 5.11 contém os marcadores de acordo com o sítio afetado. Houve maior frequência de casos displásicos >20% para c-Jun quando comparado com p-c-Jun e p27.

Tabela 5.11 - Frequência de casos com marcação positiva >20% para cJun, p-c-Jun e p27 de acordo a localização anatômica

	Fumante (n=38)		Não fumante(n=35)	
	Displásicas	Não displásicas	Displásicas	Não displásicas
c-Jun				
<i>Assoalho Bucal</i>	3	0	2	0
<i>Língua</i>	6	0	3	1
<i>Palato</i>	2	1	0	0
<i>Mucosa jugal</i>	2	2	1	0
Gengiva	1	2	1	4
Outras localizações	2	1	0	0
p-c-Jun				
<i>Assoalho Bucal</i>	1	0	2	0
<i>Língua</i>	3	0	3	1
<i>Palato</i>	1	1	0	0
<i>Mucosa jugal</i>	1	2	1	0
Gengiva	0	1	1	1
Outras localizações	0	0	0	0
p27				
<i>Assoalho Bucal</i>	0	0	1	0
<i>Língua</i>	3	0	1	3
<i>Palato</i>	2	1	0	0
<i>Mucosa jugal</i>	1	2	0	1
Gengiva	1	0	1	2
Outras localizações	3	4	0	0

Na comparação do total de positividade >20%, houve significativamente maior frequência para c-Jun, p-c-Jun e p27 em língua e assoalho bucal nas lesões displásicas do que nas não-displásicas ($p<0.0001$) (Gráfico 5.6).

Gráfico 5.6 - Representação gráfica das frequências de casos com positividade >20% para as localizações em língua e assoalho bucal em lesões displásicas e não-displásicas. Teste binomial de duas proporções ($p<0,0001$)

Foi analisada a expressão das proteínas c-Jun, p-c-Jun e p27 em lesões displásicas em fumantes e não fumantes e cruzadas essas informações **em relação ao gênero** (Tabela 5.12).

Avaliando **apenas a expressão de c-Jun** por meio do teste exato de Fisher, observou-se que houve associação significativa entre a expressão de **c-Jun** em **homens fumantes e lesões displásicas** em relação a homens não fumantes e lesões não displásicas ($p= 0.04964$).

Tabela 5.12 - Frequência de casos com marcação positiva >20% para os marcadores analisados segundo o gênero

	Fumante		Não fumante		p
	Displásicas	Não displásicas	Displásicas	Não displásicas	
c-Jun					
Masculino	11*	2	5	1	0,04964
Feminino	4	4	7	5	
p-c-Jun	4	1	5	2	
Masculino	2	3	2	0	
Feminino					
p27					
Masculino	2	4	2	0*	
Feminino	5	3	1	6	

6 DISCUSSÃO

Este estudo foi proposto objetivando verificar a influência do fumo em leucoplasia oral, cujos resultados das análises histopatológicas apresentaram presença ou ausência de displasia em pacientes fumantes e não fumantes. A associação do fumo na etiologia da leucoplasia é consistente, reprodutível e biologicamente plausível, reconhecida pela OMS.^{8,10,11,50} Entretanto, não existem resultados consensuais sobre seu exato papel na tumorigênese oral.^{11,28,32,33,39} Foram escolhidas lesões displásicas com base na noção atual de que a presença de displasia epitelial tem valor preditivo no potencial de malignidade e, lesões não displásicas, interpretadas como de menor risco, baseados no fato de que lesões aparentemente indolentes também podem evoluir para a malignidade.^{41,43,44} Avaliou-se as proteínas c-Jun e p-c-Jun por estas se mostrarem envolvidas no processo de proliferação celular^{19,20}, e a p27 por atuar como um regulador negativo do ciclo celular, inibindo a proliferação.⁸⁶

Diante do exposto, propusermo-nos a estudar se a condição fumante ou não do paciente altera a expressão destas proteínas nas lesões potencialmente malignas. Nós hipotetizamos que o tabaco aumentaria a expressão de c-Jun, com base nos estudos de Swenson et al.⁸⁰ (2011) entre outros já mencionados,^{71,72} e que não iria interferir na expressão de p27, extrapolando estudos realizados com p27 em câncer de pulmão em pacientes fumantes e não fumantes.⁷⁶

O presente estudo verificou que a ocorrência de displasia epitelial em baixo e alto risco- ($p=0.5430$) foi independente da condição de fumante ou não. Avaliando apenas a imunorreatividade das proteínas c-Jun, p-c-Jun e p27 individualmente observou-se que a expressão destas também foi independente da condição fumante do paciente ($p>0.005$). Porém, ao compararmos a imunomarcagem de c-Jun e p-c-Jun entre si, no total da amostra ($p=0.0448$) e somente para displasia em fumantes ($p=0.0165$), nota-se significativamente menor expressão de p-c-Jun. Comparando c-Jun e p27 nas displasias em não fumantes, houve significativamente maior expressão de c-Jun e menor expressão de p27 ($p=0.0079$). Ao compararmos a imunomarcagem de c-Jun de acordo com o gênero, observa-se uma relação positiva entre homens fumantes e lesões displásicas versus homens não fumantes e lesões não displásicas ($p=0.04964$). A análise do Teste binomial de duas proporções

revelou que as regiões de língua e assoalho bucal estavam mais associadas à ocorrência de lesões displásicas ($p < 0.0001$) quando comparadas a lesões não displásicas.

Em estudo prévio de nosso grupo, foram avaliados os aspectos clínico-patológicos de um total de 315 casos diagnosticados como leucoplasias em fumantes e não-fumantes. O achado mais importante deste estudo foi a associação de lesões displásicas em homens fumantes e a ocorrência de lesões displásicas em mulheres não fumantes⁹⁵, assim como também mostraram outros estudos.^{39,44,96}

No tocante à influência do fumo e o grau histológico não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os pacientes fumantes e os não fumantes ($p = 0.5430$). Contudo, observou-se maior frequência de displasia de alto risco em pacientes fumantes. Uma possível explicação pode ser a subjetividade inerente em graduar displasia, bem como a presença de variáveis clínicas embutidas, as quais por sua vez, podem interferir no perfil global de displasia, induzidas ou não, pelo tabaco. Resultados mais interessantes podem ser obtidos de amostras mais homogêneas, mesma faixa etária, gênero, localização e exposição equivalente aos carcinógenos, assim como, tempo de duração, fumante pesado (mais que 20 cigarros/dia) ou não, juntamente com um grupo controle. O sistema binário reduz a variação intra e interobservador, para duas categorias, de baixo e alto risco. Speight et al.⁵ (2007) estudando a classificação e o valor preditivo de displasia argumentam que nesta classificação em baixo e alto risco nenhum novo critério foi sugerido para alocação de cada lesão, e a análise em graduar displasia permanece subjetiva. A dificuldade maior ainda reside em se distinguir entre lesões com alteração “leve” e aquelas com alteração “moderada” para categorizar em “alto” e “baixo risco”.

Nossos resultados mostraram significância na comparação da maior expressão de c-Jun e menor expressão de p27 em lesões displásicas de pacientes não fumantes. Este resultado demonstrou que o fumo no cômputo geral não provocou nem uma maior presença de displasia, nem interferiu na expressão das proteínas estudadas. Assim, a maior expressão de c-Jun e menor expressão de p27 que aparentemente reflete um maior potencial pré-maligno, foi mais observada nas lesões displásicas de não fumantes. Estes resultados também podem ser atribuídos ao fato de em nosso estudo, entre os pacientes não fumantes, havia um maior número de mulheres. Estudo prévio, mencionado anteriormente, mostrou que a

ocorrência de lesões displásicas em mulheres não fumantes é maior do que em homens não fumantes.⁹⁵ Em adição, estudos envolvendo células mamárias têm sugerido que hormônios como estrógeno modulam positivamente a atividade transcricional de AP1. No processo de transcrição gênica pela via não clássica, o estrogênio ligado ao receptor estrogênico (RE) dimeriza-se com proteínas coativadoras (A1B1) que interagem com o DNA no sítio AP1. Através desse mecanismo de ativação da transcrição podem ser estimulados vários genes que estão relacionados com a neoplasia mamária. Esta via de sinalização alternativa é apontada como contribuinte para a resistência à terapia hormonal em câncer de mama.^{97,98}

Jordan et al.⁹¹ (1998) verificaram que p27 estava significativamente reduzida em displasias e carcinomas comparando com epitélio normal – grupo controle. Os autores relatam que existiu uma redução significativa entre os grupos de displasias de alto e baixo risco, sugerindo que as mudanças na expressão de p27 podem estar envolvidas nos eventos precoces da carcinogênese oral. Estas associações anatomoclínicas aliadas à imunopositividade de c-Jun e p27 podem ajudar o patologista no direcionamento do diagnóstico histopatológico.

Avaliando a expressão de c-Jun nos fumantes displásicos versus fumantes não displásicos não houve relação significativa, exceto quando essas informações foram cruzadas com o gênero. A imunorreatividade de c-Jun em homens fumantes com lesões displásicas ($p=0.04964$) pode ser atribuída ao número maior de casos de homens fumantes. Contudo é possível que haja correlação com fator hormonal, uma vez que estudos entre a expressão de c-Jun e a interação epitélio/mesênquima em lesão hiperplásica prostática benigna, descrevem que a expressão de c-Jun no estroma promove expressão de IGF-1 que leva à sinalização parácrina e, por conseguinte, estimula a proliferação de células epiteliais prostáticas⁹⁷. Conquanto, apesar da hiperplasia prostática não possuir componente maligno, se faz presente a natureza proliferativa correlacionada com a expressão de c-Jun. Outro estudo em câncer de pulmão avaliando as variantes genéticas de c-Jun e sua interação com o fumo e álcool mostrou um aumento significativo de risco de câncer de pulmão em homem fumante, mediado pela atividade transcricional de c-Jun via interação com fumo e álcool⁷⁶. Outras técnicas laboratoriais podem esclarecer melhor este processo.

Um resultado interessante e esperado foi a expressão diminuída de c-Jun fosforilada (p-c-Jun), tanto no total da amostra, como em lesões displásicas em fumantes ($p = 0.0169$), em relação a c-Jun não fosforilada. Isso poderia estar associado ao fato de que uma menor quantidade de lesões pré-malignas irá evoluir para carcinoma. Estudos anteriores mostram o p-c-Jun como participante na patogênese e prognóstico de câncer oral relacionado ao hábito de mascar noz de areca em Taiwan⁸². Neste estudo, os autores relataram que pacientes com carcinoma epidermoide oral, com positividade para p-c-Jun maior que 10% de marcação nas células do tumor, tiveram significativamente ($p < 0.018$) menor sobrevida global, ou seja, pior prognóstico.

Pelo gráfico 5.2, nota-se que o padrão de expressão de p-c-Jun não diferiu significativamente entre os quatro grupos, displásicas/não displásicas entre fumantes/não fumantes ($p > 0.05$). Pode-se inferir que esse resultado possa estar relacionado à limitação da expressão de determinadas proteínas, quando fosforiladas, em cortes embebidos em parafina. Seria importante investigar outras técnicas comparando a positividade de c-Jun não fosforilada e fosforilada respectivamente, c-Jun e p-c-Jun, em amostras de leucoplasia oral.

Por outro lado, a maior positividade de p-c-Jun em lesões não-displásicas, leia-se com “menor” potencial de risco, pode estar associada à presença de infiltrado inflamatório nessas lesões uma vez que a atividade de AP-1 é apontada como atuante na inflamação.⁶⁸

Ao avaliarmos a positividade de c-Jun e p27 nas lesões displásicas em pacientes fumantes e não fumantes, nota-se uma tendência de maior número de casos de c-Jun e menor número de p27 nos fumantes. Essa distribuição foi semelhante a outras descrições reportadas. Um exemplo é o trabalho de Li et al.⁸⁵ (2007), onde se verificou que o bloqueio de AP-1 contribuiu para redução da atividade proliferativa durante a fase G1 (ciclins D e E) e aumento da atividade inibitória de p27., além de estudos mostrando que a exposição aos carcinógenos presentes na fumaça do cigarro, aumenta significativamente a atividade de AP1.^{71,72,80}

Em contra partida, a maior positividade de p27 nos fumantes em relação aos não fumantes pode ser justificada pela subjetividade inerente em graduar displasia²⁵. Em suma, esses achados podem ser indicativos de que a via de sinalização envolvendo c-Jun- fosforilada/não fosforilada e p27 encontra-se ativada na

patogênese oral induzida pelo tabaco, proporcionando, portanto, novos caminhos sobre mecanismos moleculares de alterações patológicas mediadas pelo tabaco, incluindo as lesões potencialmente malignas.

Considerando o fator fumo relacionado com a imunexpressão de c-Jun, p-c-Jun e p27 individualmente no grupo das lesões displásicas, podemos dizer que apesar de não haver diferença estatisticamente significativa entre pacientes fumantes e não fumantes, hipotetizou-se que esses achados referem-se basicamente a duas interpretações: diferenças individuais em desenvolver câncer, exposição aos carcinógenos.

As diferenças individuais quanto ao risco de desenvolver câncer são atribuídas, entre outros fatores, à capacidade determinada geneticamente em ativar e detoxificar os carcinógenos do cigarro, onde a biotransformação dos carcinógenos mediadas pela classe de enzimas GSTM-1 resulta em substâncias mais hidrossolúveis facilitando sua excreção, impedindo seu acúmulo e posterior dano ao DNA. Esta classe de enzimas é importante para integridade celular e genômica, como descrito anteriormente e, como resultado, desempenha importante papel na progressão para a malignidade^{61,62}. Pode ser que a ação dessas enzimas tenha contribuído para a redução dos carcinógenos a níveis insuficientes para ativar c-Jun, p-c-Jun e p27. Estudos futuros, envolvendo a identificação de grupos de pessoas com leucoplasia, as quais possuem o hábito tabagista e possuam risco aumentado para malignidade, com base em sua capacidade de metabolizar os carcinógenos do tabaco, poderiam elucidar melhor este processo.

A segunda possibilidade refere-se à exposição aos carcinógenos do tabaco, considerando a condição fumante destes pacientes (dose cumulativa), que pode não representar risco⁵⁹, uma vez que diversos trabalhos mostram que a quantidade de tabaco consumida, 20 cigarros/dia e o tempo de consumo de 10 anos aumenta significativamente o risco de desenvolver neoplasia maligna^{37,59}. Contudo, não há consenso na literatura a este respeito^{4,8,10,11}. Geilser e Olshan⁶² em 2001, estudando o aumento de risco de câncer, propuseram que uma maneira de minimizar a heterogeneidade nas avaliações entre a interação dos fatores ambientais e os genes, seria dar maior atenção às considerações metodológicas tais como: seleção apropriada de controles, uso de incidência em vez de casos prevalentes, tamanho da amostra adequado e mensurações (tanto em doses quanto em duração) de exposição ao tabaco.⁶³

Sobre a análise semiquantitativa relacionando a localização e expressão de c-Jun, p-c-Jun e p27, podemos falar que ao compararmos as marcações em lesões displásicas e não displásicas, nas diferentes regiões, foi observado que houve maior quantidade de casos de displasia em regiões de assoalho e língua, quando comparados com as lesões não displásicas. Notou-se também maior positividade de c-Jun e menor positividade de p27 em tais regiões nas lesões displásicas, tanto em fumantes como em não fumantes. No entanto não foi significativa, provavelmente em função da quantidade da amostra representar-se reduzida. Como demonstrado na tabela 5.11

Estes resultados corroboram com a unanimidade de que língua e assoalho bucal representam regiões com maior potencial de malignização^{1,8,10}. Uma possibilidade é que estas regiões estão mais expostas aos carcinógenos do tabaco que se encontram diluídos na saliva e apresentam maior permeabilidade. Esta associação de c-Jun e p27 reafirma, mais uma vez, que as análises clínica, anatomopatológica e os biomarcadores podem auxiliar na conduta do diagnóstico.

7 CONCLUSÃO

1. Na amostra estudada, não houve correlação entre fumo e grau de displasia.
2. A expressão das proteínas c-Jun, p-c-Jun e p27 avaliadas individualmente foi independente da condição fumante do paciente.
3. As localizações em língua e assoalho bucal estão mais associadas à ocorrência de displasia .
4. A positividade aumentada de c-Jun e a imunorreatividade diminuída de p27 pode auxiliar o patologista no direcionamento do diagnóstico.

REFERÊNCIAS¹

1. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(1):47–62.
2. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; 36(10):575-80.
3. Brennan M, Migliorati CA, Lockhart PB, Wray D, Al-Hashimi I, Axéll T, et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103:S19.e1-12.
4. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncol*. 2006;42(5):461–74.
5. Speight PM. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head Neck Pathol*. 2007 Sep;1(1):61-6.
6. Shiu MN, Chen TH, Chang SH, Hahn LJ. Risk factors for leukoplakia and malignant transformation to oral carcinoma: a leukoplakia cohort in Taiwan. *Br J Cancer*. 2000 Jun 82;(11):1871-4.
7. Ho PS, Chen PL, Warnakulasuriya S, Shieh TY, Chen YK, Huang IY. Malignant transformation of oral potentially malignant disorders in males: retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 2009 Jul 30;9:260.
8. Amagasa T. Oral premalignant lesions. *Int J Clin Oncol*. 2011 Feb;16(1):5–14.
9. Pitiyage G, Tilakaratne WM, Tavassoli M, Warnakulasuriya S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol Med*. 2009 Nov;38(10):737-52.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

10. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol* 2010;46:423-5.
11. Jaber MA. Oral epithelial dysplasia in non-users of tobacco and alcohol: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcome. *J Oral Sci.*2010 Marc;52(1):13-21.
12. A digital manual for the early diagnosis of oral neoplasia. [Cited 2011 Jul 22]. Available from: <http://screening.iarc.fr/atlasoral.php>
13. Goodger NM, Gannon J, Hunt T, Morgan PR. Cell cycle regulatory proteins — an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncol.* 1997;33:61-73.
14. Kouvaraki MA, Rassidakis GZ, Tian L, Kumar R, Kittas C, Claret FX. Jun activation domain-binding protein 1 expression in breast cancer inversely correlates with the cell cycle inhibitor p27(Kip1). *Cancer Res.* 2003; 63:2977-81.
15. Kouvaraki MA, Korapati AL, Rassidakis GZ, Tian L, Zhang Q, Chiao P, et al. Potential role of Jun activation domain-binding protein 1 as a negative regulator of p27kip1 in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2006 Sep 1;66(17):8581-9.
16. Bagui TK, Cui D, Roy S, Mohapatra S, Shor AC, Ma L, et al. Inhibition of p27^{Kip1} gene transcription by mitogens. *Cell Cycle* 2009; 8:115-24.
17. Kudo Y, Takata T, Yasui W, Ogawa I, Miyauchi T, Takekoshi T, et al. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 is a indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 1998; 83:2447-55.
18. Mineta H, Miura K, Suzuki I, Takebayashi S, Amano H, Araki K, et al. Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cells carcinoma. *Cancer* 1999;85:1011-7.
19. Sousa SOM, Mesquita RA, Pinto Jr DS, Gutkind S. Immunolocalization of c-Fos and c-Jun in human oral mucosa and in oral squamous cell carcinoma. *Int J Pathol Med* 2002;31:78-81.
20. Turatti E, Neves AC, de Magalhães MH, de Sousa SO. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Sci* 2005;47:71-6.

21. Mointeil RA. Oral leukoplakia: clinical or histologic entity? *Ann Pathol*. 1983;3(3):257-61.
22. Chiu CT, Li CF, Li JR, Wang J, Chuang CY, Chiang WF, et al. Candida invasion and influences in smoking patients with multiple oral leucoplakias--a retrospective study. *Mycoses*. 2011 Sep;54(5):e377-83.
23. Axell T, Pindborg JJ, Smith CJ van der Waal I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden. *J Oral Pathol Med* 1996;25:49-54.
24. Sankaranarayanan R, Thara S. Upper aerodigestive tract. In: Franco EL, Rohan TE, editors. *Cancer precursors*, New York, Springer; 2002. p. 72-95.
25. 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;42:987-93.
26. 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;37:127-33.
27. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol*. 2003;39(8):770-8.
28. Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2008;37:1-10.
29. Reichart PA. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. *Clin Oral Invest*. 2001;5:207-13.
30. Nagao T, Ikeda N, Fukano H, Hashimoto S, Shimozato K, Warnakulasuriya S. Incidence rates for oral leukoplakia and lichen planus in a Japanese population. *J Oral Pathol Med*. 2005;34:532-9.
31. Gupta PC, Mehta FS, Daftary DK, Pindborg JJ, Bhonsle RB, Jainawalla PN, et al. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dent Oral Epidemiol* 1980;8:283-333.

32. Silverman S, Jr., Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984;53:563-8.
33. Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol.* 1998;34:270-5.
34. Cerero-Lapiedra R, Balade-Martinez D, Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez G, Bagan JV. Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15:839-45.
35. Woo SB, Lin D. Morsicatio mucosae oris--a chronic oral frictional keratosis, not a leukoplakia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009 Jan;67(1):140-6.
36. van der Wall I. Potentially malignant disorders of the oral mucosa and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009;45:317-23.
37. Jaber MA, Porter SR, Gilthorpe MS, Bedi R, Scully C. Risk factors for oral epithelial dysplasia--the role of smoking and alcohol. *Oral Oncol.* 1999 Mar;35(2):151-6.
38. Hamadah O, Goodson ML, Thomson PJ. Clinicopathological behaviour of multiple oral dysplastic lesions compared with that of single lesions. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Oct;48(7):503-6.
39. Jaber MA. Oral epithelial dysplasia in non-users of tobacco and alcohol: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcome. *J Oral Sci.* 2010 Mar;52(1):13-21.
40. Roosaar A, Yin L, Johansson AL, Sandborgh-Englund G, Nyrén O, Axéll T. A long-term follow-up study on the natural course of oral leukoplakia in a Swedish population-based sample. *J Oral Pathol Med.* 2007 Feb;36(2):78-82.
41. Lim K, Moles DR, Downer MC, Speight PM. Opportunistic screening for oral cancer and precancer in general dental practice: results of a demonstration study. *Br Dent J.* 2003 May 10;194(9):497-502.

42. Dietrich T, Reichart PA, Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol.* 2004 Feb;40(2):158-63.
43. Liu W, Wang YF, Zhou HW, Shi P, Zhou ZT, Tang GY. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. *BMC Cancer.* 2010 Dec 16;10:685.
44. Shiu MN, Chen TH, Chang SH, Hahn LJ. Risk factors for leukoplakia and malignant transformation to oral carcinoma: a leukoplakia cohort in Taiwan. *Br J Cancer.* 2000, 82:1871-4.
45. Hansen LS, Olson JA, Silverman S, Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;60(3):285-98.
46. Bishen KA, Sethi A. Proliferative verrucous leukoplakia- diagnostic pitfalls and suggestions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009;14(6):E263-4.
47. Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carassi A. Interventions for treating oral leukoplakia (Cochrane review). *The Cochrane Library* 2007; 2 [cited 2007 Nov. 2]. Available from: <http://cochrane.bvsalud.org>.
48. Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med.* 2008 Feb;37(2):63–9.
49. World Health Organization. [Cited 2012 Jul 10]. Available from: www.who.int/tobacco/wntd/2012/announcement/en/index.html.
50. Organização Mundial da Saúde (OMS). [Cited 2012 Jul 10]. Guidelines for the conduct of tobacco smoking among health professionals. Report WHO. Meeting Winnipeg, Canadá, jul.7-9,1983.
51. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Falando sobre tabagismo. 3ª Ed. Brasília, DF; 1998[Citado em julho de 2012]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/busca>.
52. The American Cancer Society [Cited 2012 Jul 10]. Available from: <http://www.cancer.org/Search/index?QueryText=tobacco>
53. Organização Pan-Americana da Saúde [Citado em julho de 2012]. Disponível em: www.opas.org.br/sistema/arquivos/agenda07.

54. Instituto Nacional de Câncer - INCA [Citado em julho de 2012]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/tabagismo/frameset.asp?item=atualidades&link=lista.asp>).
55. Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002 Oct 21;21(48):7435-51. Review.
56. Duarte EC, Ribeiro DC, Gomez MV, Ramos-Jorge ML, Gomez RS. Genetic polymorphisms of carcinogen metabolizing enzymes are associated with oral leukoplakia development and p53 overexpression. *Anticancer Res*. 2008 Mar-Apr;28(2A):1101-6.
57. Secretan B, Straif K, Baan R, Grosse Y, Ghissassi F, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens—Part E: tobacco, areca nut, alcohol, coal smoke, and salted fish. *Lancet Oncol*. 2009 nov;10(11):1033-4.
58. Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K. The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol*. 2001 Jul;14(7):767-90.
59. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans; 2012. Vol. 100.:Part E. Personal habits and indoor combustions.
60. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jul 21;91(14):1194-210.
61. Shukla D, Kale AD, Hallikerimath S, Vivekanandhan S, Venkatakanthaiah Y. Genetic polymorphism of drug metabolizing enzymes (GSTM1 and CYP1A1) as risk factors for oral premalignant lesions and oral cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2012. DOI: 10.5507/bp.2012.013.
62. Geisler SA, Olshan AF. *Am J Epidemiol*. 2001 Jul 15;154(2):95-105. GSTM1, GSTT1, and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a mini-HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2001 Jul 15;154(2):95-105.
63. Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1999;39:295-312. Review.

64. Foletta VC. Transcription factor AP-1, and the role of Fra-2. *Immunol Cell Biol.* 1996 Apr;74(2):121-33.
65. Vogt PK. Jun, the oncoprotein. *Oncogene.* 2001 Apr 30;20(19):2365-77.
66. Lopez-Bergami P, Lau E, Ronai Z. Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010 Jan;10(1):65-76.
67. Szabo E, Riffe ME, Steinberg SM, Birrer MJ, Linnoila RI. Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 1996;56:305-15.
68. Vleugel MM, Greijer AE, Bos R, van der Wall, Diest, PJ. c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. *Hum Pathol.* 2006 Jun;37(6) 668-74.
69. Hunter T, Karin M. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell.* 1992 Aug 7;70(3):375-87.
70. Rorke A, Adhikary G, Jans R, Crish JF, Eckert L. AP1 factor inactivation in the suprabasal epidermis causes increased epidermal hyperproliferation and hyperkeratosis but reduced carcinogen-dependent tumor formation. *Oncogene.* 2010 Nov 4; 29(44):5873-82.
71. Manna SK, Rangasamy T, Wise K, Sarkar S, Shishodia S, Biswal S, et al. Long term environmental tobacco smoke activates nuclear transcription factor- κ B, activator protein-1 and stress responsive kinases in mouse brain. *Biochem Pharmacol.* 2006 May 28;71(11):1602-9.
72. Zhong CY, Zhou YM, Douglas GC, Witschi H, Pinkerton KE. MAPK/AP-1 signal pathway in tobacco smoke-induced cell proliferation and squamous metaplasia in the lungs of rats. *Carcinogenesis.* 2005 Dec;26(12):2187-95.
73. Maki Y, Bos C, Davis C, Starbuck M, Vogt P. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 1987 May;84(9):2848–52.
74. Ransone LJ, Verma IM. Nuclear proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Cell Biol.* 1990;6:539-57.

75. Whitmarsh J, Davis RJ. Regulation of transcription factor function by phosphorylation. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Aug;57(8-9):1172–83.
76. Huang B, Liu B, Yang L, Li Y, Cheng M, Huang D, et al. Functional genetic variants of c-Jun and their interaction with smoking and drinking increase the susceptibility to lung cancer in southern and eastern Chinese. *Int J Cancer*. 2012 Sep 1;131(5):E744-58.
77. Rassidakis GZ, Claret FX, Lai R, Zhang Q, Sarris AH, McDonnell TJ, et al. Expression of p27(Kip1) and c-Jun activation binding protein 1 are inversely correlated in systemic anaplastic large cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1121-8.
78. Scully C. Oncogenes, tumour suppressors and viruses in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1993;22(8):337-47.
79. Ozanne BW, Spence H J, McGarry LC, Hennigan RF. Transcription factors control invasion. AP1 the first among equals. *Oncogene*. 2007 Jan 4;26(1):1-10.
80. Swenson WG, Wuertz BR, Ondrey FG. Tobacco carcinogen mediated up-regulation of AP-1 dependent pro-angiogenic cytokines in head and neck carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 2011 Sep;50(9):668-79.
81. Acay RR, dos Santos E, de Sousa SO. Correlation between c-Jun and human papilloma- virus in oral premalignant and malignant lesions. *Oral Oncol*. 2008 Jul; 44(7):698-702.
82. Kuo RC, Lin CY, Kuo MY. Prognostic role of c-Jun activation in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Formos Med Assoc*. 2006;105(3):229-34.
83. Papachristou DJ, Batistatou A, Sykiotis GP, Varakis I, Papavassiliou AG. Activation of the JNK-AP-1 signal transduction pathway is associated with pathogenesis and progression of human osteosarcomas. *Bone*. 2003 Apr;32(4):364-71.
84. Gee JM, Barroso AF, Ellis IO, Robertson JFR, Nicholson RC. Biological and clinical associations of c-jun activation in human breast cancer. *Int J Cancer*. 2000;89(2):177:86.

85. Li W, Wu CL, Febbo PG, Olumi AF. Stromally expressed c-Jun regulates proliferation of prostate epithelial cells. *Am J Pathol* 2007;171(4):1189-98.
86. Lee J, Kim SS. The function of p27 KIP1 during tumor development. *Exp Mol Med*. 2009 Nov 30;41(11):765-71. Review.
87. Besson A, Gurian M, Chen X, Spratt KS, Kemp CJ, Roberts JM. A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev*. 2006 Jan 1;20(1):47-64.
88. Bagui TK, Cui D, Roy S, Mohapatra S, Shor AC, Ma L, et al. Inhibition of p27^{Kip1} gene transcription by mitogens. *Cell Cycle* 2010 Feb 12; 285(7):4554-61.
89. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*. 2008 Feb;14(2):159-69.
90. Borriello A, Bencivenga D, Criscuolo M, Caldarelli I, Cucciolla V, Tramontano A et al. Targeting p27Kip1 protein: its relevance in the therapy of human cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2011 Jun;15(6):677-93.
91. Jordan RCK, Bradley G, Slingerland J. Reduced levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip in epithelial dysplasia and carcinoma of the oral cavity. *Am J Pathol*. 1998 Feb;152(2):585-90.
92. Saito T; Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 1999; 28(5):226-32.
93. Kovesi G, Szende B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2006; 35(5):274-7.

94. Ribeiro DC, Gleber-Netto FO, Sousa SF, Bernardes VF, Guimarães-Abreu MH, Aguiar MC. Immunohistochemical expression of EGFR in oral leukoplakia: Association with clinicopathological features and cellular proliferation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Sep 1;17(5):e739-44.
95. Lima JS, Pinto Jr DD, Sousa SO, Corrêa L. Oral leukoplakia manifests differently in smokers and non-smokers. *Braz Oral Res*. 2012 Sep 27..DOI: 10.1590/S1806-83242012005000024
96. Cortes ARG. Comparação imunoistoquímica das expressões das proteínas p27 e c-jun na carcinogênese intra-oral [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2009.
97. Freitas MD, Blanco-Carrion A, Gandara-Vila, Antúñez-López J, García-García A, Gándara Rey JM. Clinicopathologic aspects of oral leukoplakia in smokers and nonsmokers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Aug; 102(2):199-203.
98. Osborne CK; Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *Journal of Clinical Oncology*. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 10;23(8):1616-22.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 184/2010
CAAE 0034.0.017.000-10

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "Expressão imunoistoquímica das proteínas C-Jun e P27 em leucoplasia em pacientes tabagistas e não fumantes", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) **Joelma Sousa Lima** sob orientação da Profa. Dra. **Suzana Cantanhe Orsini Machado de Sousa**.

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 a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 09 de dezembro de 2010.

Prof. Dra. **Marcia Turilli Wanderley**
Coordenadora do CEP-FOUSP