ALADIM GOMES LAMEIRA

**Expressão Imuno-Histoquímica das Proteínas ki-67, MCM3 e p27 em
Leucoplasias e Carcinoma Epidermoide de Boca**

São Paulo

2013

ALADIM GOMES LAMEIRA

**Expressão Imuno-Histoquímica das Proteínas ki-67, MCM3 e p27 em
Leucoplasias e Carcinoma Epidermóide de Boca**

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Décio dos Santos Pinto Junior.

São Paulo

2013

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 da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Lameira, Aladim Gomes

Expressão imuno-histoquímica das proteínas ki-67, MCM3 e p27 em leucoplasias e carcinoma epidermoide de boca / Aladim Gomes Lameira; orientador Décio dos Santos Pinto Junior. -- São Paulo, 2013.

87 p.: il. : fig.; 30 cm.

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

Versão corrigida.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Leucoplasia bucal. 3. Proteínas de matriz extracelulares. 4. Imunohistoquímica. I. Pinto Junior, Décio dos Santos. II. Título.

Lameira AG. Expressão imuno-histoquímica das Proteínas ki-67, MCM3 e p27 em leucoplasias e carcinoma epidermoide de boca. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /2013

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Raimundo Santana Lameira exemplo de Humildade e simplicidade (*in memorian*).

A minha Vó e Mãe Crispiana Santana Lameira que soube me dar carinho e atenção de uma verdadeira mãe (*in memorian*).

A minha tia Lourdes Lameira Braga, obrigado por ter me ensinado os primeiros passos da instrução e educação.

Ao meu tio Manoel da Silva Braga meu primeiro mestre, instrutor, responsável pela minha carreira universitária tento seguir seus passos (*in memorian*).

A Deborah, minha filha, colega de profissão, obrigado pelo abstract, tenho certeza que terá uma carreira Universitária brilhante, te admiro muito.

Ao meu filho Aladim Jr. colega de especialidade, tenho certeza que serás um grande cirurgião Bucomaxilofacial, te admiro muito.

A Milena Moreira Lima, companheira, admiradora, incentivadora, muito obrigado pela força e tranquilidade e compreensão principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador Prof. Décio Santos Pinto Jr. muito obrigado por ter aceitado nos orientar, todos os elogios que o prof. Hélder Pontes lhe faz, hoje tenho certeza que são verdadeiros, você é realmente um grande mestre.

Ao meu coorientador Prof. Helder Pontes, mentor deste trabalho, ex-aluno, hoje grande parceiro, tenho certeza que o professor Décio Santos fez um grande mestre, seu trabalho no Serviço de Patologia Bucal do Hospital Universitário João de Barros Barreto da UFPA é admirável em termo de ensino, pesquisa e extensão, tenho orgulho compartilhar com você.

A Prof.^a Flávia Pontes muito obrigado pela origem do projeto.

Ao Prof. Helder Pinheiro pela Análise estatística, muito obrigado.

Ao Prof. Nicolau Conte pela Análise estatística.

Ao meu ex-aluno e amigo Douglas Magno: você é um exemplo de carreira universitária, foi inicialmente orientado pelo Prof. Helder Pontes e agora esta sendo refinado pelos grandes mestres Decio Santos e Fabio Daumas, muito obrigado pela padronização das proteínas, confecção das laminas e graduação das displasias.

A todos os professores responsáveis pela realização deste programa de grande importância para nossa carreira universitária. Em especial os professores de Patologia Bucal da USP, muito obrigado pelos ensinamentos e amizade.

Ao professor Armando Chermont e professora Cecy Martins pela idealização do Dinter-Belém.

A USP, UFPA e CAPES pelo incentivo deste programa.

A Zilda e Néia meu muito obrigado pela atenção.

Ao Flaviano, obrigado pelo auxílio na formatação.

Aos alunos da Residência em CTBMF, Oncologia, Estagiários, CD, funcionários do HUJBB, muito obrigado.

RESUMO

Lameira AG. Expressão imuno-histoquímica das proteínas ki-67, MCM3 e p27 em leucoplasias e carcinoma epidermoide de boca [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Versão Corrigida.

O propósito deste estudo foi identificar o padrão de expressão de Ki-67, MCM3 e p27 em mucosa normal (MN), em leucoplasias de orais (leves, moderadas e intensas) e em carcinomas epidermóides de boca (CEB), com objetivo de sugerir a participação dessas proteínas na aquisição do fenótipo maligno. Os espécimes foram removidos de 37 pacientes com leucoplasias bucais (13 com displasias leves-DL, 12 com displasias moderadas-DM e 12 com displasias intensas-DI). Onze amostras de mucosa normal de soalho bucal (MN) e 50 amostras de CEB de soalho e língua de pacientes não tratados foram incluídas neste estudo. As amostras foram imunomarcadas com anticorpos contra, Ki-67, MCM3 e p27. O teste Kruskal Wallis e o teste de Dunns foram usados para determinar a diferença dos grupos entre si. Para avaliar a correlação das proteínas entre si foi utilizado o teste de correlação de Pearson. Ki-67 mostrou índices de marcação estatisticamente maior em casos de CEB quando comparados com o grupo que continha MN ($p < 0.001$) e DL ($p < 0.01$) e índices de marcação estatisticamente menor na MN quando comparada com os grupos que continham DM e DI ($p < 0.05$). A proteína p27 mostrou índice de expressão estatisticamente menor quando as amostras com CEB foram comparadas com os grupos que continham a MN, DL; DM e DI ($p < 0.001$). A proteína MCM3 mostrou índices de marcação estatisticamente menor no grupo que continha a MN quando se correlacionou com o que apresentava DI e CEB ($p < 0.001$) e o grupo com DL mostrou índices estatisticamente menores quando foi correlacionado tanto com o grupo de DI ($p < 0.01$) quanto com o que continha as amostras de CEB ($p < 0.001$). Outros resultados dignos de nota foram a significativa correlação entre as proteínas MCM3 e p27 ($r = 0.31$ e $p < 0.03$), Ki-67 e p27 ($r = 0.31$ e $p < 0,03281$) e MCM3 e ki-67 ($r = 0,69$ $p < 0,01$) em CEB e MCM3 e p27 ($r = 0.58$ e $p < 0.05$) em displasia moderadas. Também observamos correlação estatisticamente significativa nas amostras que continham mucosa normal entre as proteínas Ki-67 e p27 ($r = 0.83$ e $p < 0.01$), MCM3 e p27 ($r = 0.62$ e $p < 0.04$) e MCM3 e Ki67 ($r = 0.65$ e $p < 0.03$). É

importante resaltar a forte correlação entre a proteína Ki-67 e MCM3 quando a proporção de imunomarcacão é observada em todas as lesões em conjunto ($r=0.76$ e $p< 0.0001$). Em conclusão, MCM3 apresenta-se como um melhor marcador de proliferação do que a proteína Ki-67 para avaliar lesões displásicas bucais, que a relação entre MCM3 e p27 em displasia moderada e Ki-67 e MCM3 em displasias intensas podem ser úteis para identificar a relação proliferação e diferenciação celular.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide de boca. Leucoplasia orais. Imunoistoquímica. Proteínas.

ABSTRACT

Lameira AG. Immunohistochemical expression of ki-67 protein, MCM3 and p27 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the mouth [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2013. Corrected Version.

The aim of this study was to identify the expression of MCM3, Ki-67 and p27 in normal mucosa (MN) in leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma Epidemiology (OSCCE), and to determine whether altered expression could serve as a prognostic marker of a malignant progression of dysplasia lesions. The samples were collected from 37 patients with oral leukoplakia (13 with mild dysplasia - MLD, 12 with moderate dysplasia - MD and 12 with severe dysplasia - SD). Eleven samples of mouth floor mucocele (M) and 50 floor and tongue samples OSCCE of untreated patients were included in this study. Immunohistochemical MCM3, Ki-67 and p27 expression of all the groups was analyzed. Kruskal Wallis and Dunns test were used to determine differences among groups, and a Pearson correlation test was used to evaluate the correlation between the proteins. Ki-67 expression was higher in OSCCE than M ($p<0.001$) and MLD ($p<0.01$) groups, and there was a lower expression in MN compared with MD and ID ($p<0.05$). Ki-67 expression did not show significant difference between MD, SD and OSCCE. Regarding p27, its expression was lower in OSCCE compared with M, MD and SD ($p<0,001$). MCM3 expression was lower in M compared with SD and OSCCE ($p<0.001$) and MLD showed a lower expression when compared SD ($p<0.01$) and OSCCE ($p<0.001$). The present study showed that MCM3 could be a better marker than Ki67 for evaluation dysplastic oral lesions.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma. Leukoplakia. Immunohistichemistry. Proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 - Expressão imuno-histoquímica da proteína Ki-67 em mucocelo (A), displasia leve (B), displasia moderada (C), displasia intensa (D) e carcinoma epidermoide E) (400x).....	47
Figura 5.2 - Análise de Ki-67 em mucocelo, displasia leve, moderada e intensa e em carcinomas.....	48
Figura 5.3 - Expressão imuno-histoquímica da proteína MCM3 em mucocelo (A), displasia leve (B), displasia moderada (C), displasia intensa (D) e carcinoma epidermoide (E) (400x).....	49
Figura 5.4 - Análise de MCM3 em mucocelo, displasia leve, moderada e intensa e em carcinomas.....	50
Figura 5.5 - Expressão imuno-histoquímica da proteína p27 em mucocelo (A), displasia leve (B), displasia moderada (C), displasia intensa (D) e carcinoma epidermoide (E) (400x)	51
Figura 5.6 - Análise de p27 em mucocelo, displasia leve, moderada e intensa e em carcinomas.....	52
Figura 5.7 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27, ki-67 e MCM3 em lesões de Carcinoma.....	53
Figura 5.8 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27, ki-67 e mcm-3 em lesões de Displasia Leve.....	53
Figura 5.9 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27, ki-67 e MCM3 em lesões de Displasia Moderada.....	54
Figura 5.10 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27, ki-67 e mcm-3 em lesões de Displasia Intensa.....	54
Figura 5.11 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27, ki-67 e mcm-3 em lesões de Mucocelo.....	55

Figura 5.12 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27 e ki-67 nas lesões bucais.....	55
Figura 5.13 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27 e mcm-3 nas lesões bucais.....	56
Figura 5.14 - Correlação da proporção de marcação das proteínas ki-67 e mcm-3 nas lesões bucais.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

⁂MN	Mucosa normal
CEB	Carcinoma Epidermoides de Boca
DL	Displasias leves
DM	Displasias moderadas
DI	Displasias intensas
MCM	Minichromosome maintenance Proteins
ORC	Origin recognition complex
ATP	Trifosfato de Adenosina
TGF-β	Fator de crescimento tecidual
NLS	Sinal de localização Nuclear
AML	Leucemia Mielóide Aguda
ALL	Leucemia Linfóide Aguda
MEN	Neoplasia Endócrina Múltipla

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Carcinoma Epidermoide	15
2.1.1 Epidemiologia	16
2.1.2 Fatores de risco	17
2.1.2.1 tabaco	17
2.1.2.2 álcool	19
2.1.3 Características clínicas	20
2.1.4 Características histopatológicas	21
2.1.5 Tratamento	22
2.2 Lesões potencialmente malignas e displasias epitelial	23
2.2.1 Leucoplasia	23
2.2.2 Eritroplasia	25
2.2.3 Eritroleucoplasia	25
2.3 Proteína ki-67	27
2.4 Família das proteínas de manutenção do minicromossoma(MCM)	32
2.4.1 Relação das proteínas MCM com neoplasias malignas 4 Família das proteínas de manutenção do minicromossoma(MCM)	34
2.5 Proteína p27	37
3 PROPOSIÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 Amostras dos Tecidos	43
4.2 Reações Imuno-histoquímicas	43
4.3 Análise da Imunomarcação	45
4.4 Análise Estatística	45
5 RESULTADOS	47
5.1 Proteína Ki-67	47
5.2 Proteína MCM3	48
5.3 Proteína p27	50
5.4 Proporção de Marcação das Proteínas p27,ki-67 e MCM3 em Carcinomas	52

5.5 Proporção de Marcação das Proteínas p27, Ki-67 e MCM3 em Displasias leves	53
5.6 Proporção de Marcação das Proteínas p27, Ki-67 e MCM3 em Displasias moderadas	53
5.7 Proporções de Marcação das Proteínas p27, Ki-67 e MCM3 em Displasias intensa.....	54
5.8 Proporções de Marcação das Proteínas p27, Ki-67 e MCM3 em Mucosa normal	54
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO.....	8

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide de boca corresponde a 95% do total das neoplasias malignas orais. Mesmo com os recentes avanços no tratamento cirúrgico, quimioterápico e radioterápico, o prognóstico dos pacientes portadores dessas neoplasias não tem melhorado, com taxa de sobrevida em cinco anos ficando em torno de 30% a 50%, em varias parte do mundo.(Vora et al., 2003; Chin et al., 2005; Pontes et al., 2011)

A leucoplasia é a mais prevalente lesão pré-maligna ou potencialmente maligna da boca. A presença de displasia parece ser o mais utilizado indicador prognóstico da transformação maligna das leucoplasias e muitos dos casos de carcinomas de boca, se não todos, são precedidos por um período de displasia (Pontes et al., 2009; Torres-Rendon et al., 2009). Entretanto a graduação histológica possui valor limitado em predizer o risco de pacientes individualmente. Além disso, a graduação histológica das displasias encontra dificuldades associadas à subjetividade do avaliador (Tarbor et al., 2003; Kovesi; Szende, 2006). Estudos do grau de proliferação celular e da apoptose, assim como a expressão de genes que regulam esses processos podem auxiliar a predizer quais lesões displásicas possuem maior probabilidade de transformação em carcinomas epidermoides orais (Kovesi; Szende, 2006; Pontes et al., 2013).

A proteína Ki-67 encontra-se expressa em células que estão proliferando, mas desaparece rapidamente quando a célula entra no estado de repouso. Tal característica tem feito com que a proteína Ki-67 seja exaustivamente utilizada para demonstrar a fração de células que se encontram proliferando em um tecido (Scholzen; Gerdes, 2000). A proteína p27 tem sido utilizada como marcador de diferenciação celular. Essa proteína é uma inibidora de kinase dependente de ciclina, que atua bloqueando a entrada na fase S do ciclo celular. Aumento de expressão poder ser observado em vários carcinomas humanos (Kovesi; Szende, 2006; Abukdheir; Park, 2007). Outro grupo de proteínas recentemente investigada é a família das proteínas mantenedoras do cromossomo (MCM, do inglês mini-chromosome maintenance proteins). Elas estão envolvidas nos estágios precoces de replicação do genoma eucariótico e acredita-se que sirvam como componente da maquinaria de replicação normal, o qual garante que ocorra a duplicação do DNA

apenas uma vez por ciclo. Todos os seis membros da família MCM, MCM2 a MCM7, formam um complexo e sua regulação é essencial para replicação do DNA (Yoshida, 2005; Staed et al., 2009; Chuang et al., 2012). Alguns estudos têm utilizados essas proteínas em lesões potencialmente malignas (;Davies et al., 2002; Chatrath et al., 2002; Going et al., 2002) Williams et al., 1998; Freeman et al., 1999.), além de já ter sido mostrado que membros da família Mcms possuem relação com o grau de diferenciação celular e com o prognóstico de carcinomas epidermóides de boca (Szelachowska et al., 2006;Tamura et al., 1998; Gouvêa et al., 2010;).

Endl et al. (2001) demonstraram que a passagem das células, da mucosa oral do compartimento proliferativo para diferenciação é acompanhado pelo desaparecimento da expressão das proteínas Ki-67 e MCM3 e que este processo precede o aumento da expressão da proteína p27. Além disso, os autores afirmaram que a diminuição da regulação de Ki-67 acontece com a redução da atividade proliferativa, entretanto, o início da diminuição da expressão da proteína MCM3 acontece em uma fase posterior. A proteína MCM3, portanto, não pode substituir a proteína Ki-67 na avaliação da proliferação celular. Essas informações indicam que a avaliação em conjunto dessas proteínas pode ser uma ferramenta útil para dimensionar quais células estão proliferando, quais estão em repouso e quais estão se diferenciando.

O propósito deste estudo é avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas Ki-67, MCM3 e P27 em leucoplasias, com diferentes graus de displasias (leve, moderada e intensa), e em carcinomas epidermóides de boca com objetivo de sugerir a participação dessas proteínas na aquisição do fenótipo maligno.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura está subdividida por tópico para melhor visualização do quadro referencial teórico.

2.1 Carcinoma Epidermoide

A carcinogênese oral é um processo multifásico, onde componentes genéticos levam a desregulação de vias de sinalização celular que controlam funções celulares básicas, como divisão, diferenciação e morte celular. Anos atrás, acreditava-se que a gênese do carcinoma epidermoide bucal estava relacionada a poucos eventos genéticos, por volta de seis a dez alterações, que possivelmente eram as responsáveis pela iniciação e promoção dessa patologia (Todd et al., 1995). Atualmente sabe-se que essas alterações são mais complexas do que se imaginava, envolvendo diversos mecanismos ainda pouco compreendidos.

O processo de progressão tumoral do carcinoma epidermoide oral é representado por algumas fases caracterizadas pela presença de alterações teciduais particulares, como: hiperplasia epitelial, displasia epitelial, carcinoma in situ, carcinoma invasivo e metástase. A hiperplasia epitelial é caracterizada por uma hiperproliferação celular, no entanto as células encontram-se morfológicamente normais e estruturalmente preservadas. Contrariamente, no epitélio displásico, as células tendem a apresentar alterações morfológicas e estruturais, características também da fase de carcinoma in situ. No carcinoma in situ as células encontram-se em um estágio altamente proliferativo e desorganizado, arquiteturalmente e citologicamente, contudo, continuam restritas ao epitélio. Já o carcinoma epidermoide invasivo as células neoplásicas já apresentam um rompimento da membrana basal, iniciando o processo de invasão tecidual. Finalmente, o processo de metástase ocorre quando as células tumorais atingem órgãos à distância, por meio da disseminação vascular ou linfática (Moral; Paramino, 2008).

A transição epitélio-mesenquimal é um evento que vem sendo implicado nos processos de invasão e metástase tumoral. Esse processo é caracterizado pela alteração da expressão de componentes estruturais epiteliais por componentes mesenquimais, que tornam viável a perfusão das células neoplásicas epiteliais pelos tecidos adjacentes. As células sob esse processo perdem sua polaridade basal e apresentam alterações fenotípicas, ganhando maior capacidade de migração através da matriz extracelular (Smith, 2005; Shibata et al., 2008).

2.1.1 Epidemiologia

Dados fornecidos pelo INCA (Instituto Nacional Câncer, 2012), referente a incidência do câncer de boca nas diversas regiões geográficas do Brasil mostram que dos 518.510 novos casos desta doença, estima-se que 21.700 ocorram na região Norte, enquanto que 88.350, 44.630, 90.940 e 272.890 são esperados para as regiões Nordeste, Centro-oeste, Sul e Sudeste, respectivamente. O câncer de mama é a neoplasia que deverá apresentar as maiores taxas de ocorrência, seguido pelo de traqueia, brônquio, pulmão, estômago, próstata e colo de útero, com o carcinoma de boca sendo considerado a nona mais frequente no Brasil.

O carcinoma epidermoide de boca apresenta uma grande variação nas diversas áreas geográficas ao redor do mundo principalmente como consequências de sua estreita relação com determinados hábitos culturais e diversos fatores de risco conhecidos, como uso de tabaco e álcool (Wunsch-Filho, 2002; Bell et al., 2007). Segundo Muwonge et al. (2007), países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos apresentam maiores taxas de carcinoma epidermoide de boca do que os países desenvolvidos. Em determinadas regiões da França, do Sudeste da Ásia, Sul da Índia, Paquistão, Bangladesh, Sri Lanka, em certas áreas da Europa Central e Oriental o carcinoma epidermoide de boca é uma das neoplasias que mais frequentemente acomete os Homens. Entre as mulheres, a maior incidência é observada na Índia, onde este carcinoma representa a terceira neoplasia mais frequente, com um aumento moderado em determinadas regiões na Europa observado durante as décadas de 80 a 90 (Yeole BB; Ramanakumar AV.; Sankaranayanan R., 2003; Ahluwalia, 2005; Capilla et al., 2007).

2.1.2 Fatores de risco

Um carcinógeno pode ser definido como sendo uma molécula que, após sofrer transformação pela lise, oxidação ou por ação física, modifica sítios específicos do DNA de células responsáveis pelo controle do ciclo e da função celular normal, causando a iniciação no processo celular de multiplicação, invasão, ou simplesmente como um agente causador de neoplasia maligna. Porém, devido toda complexidade que envolve o mecanismo de carcinogênese, prefere-se definir como carcinógeno todo agente químico, físico ou biológico que possua influência cientificamente comprovada na produção de carcinoma (Parise Jr, 2000).

Estudos de Ide et al. (2008), relataram que indivíduos que utilizavam exageradamente tabaco e álcool apresentavam um risco de 38 vezes maior de desenvolverem carcinoma epidermoide de boca se comparados com os que não faziam uso destas substâncias, sendo que baseado no risco estimado para estes grupos de indivíduos, acredita-se que cerca de 75% de todos os carcinomas orais poderiam ser evitados com o abandono destes hábitos.

Apesar da ação individual do tabaco já ter sido estabelecido, o papel do álcool na carcinogênese oral ainda não está totalmente esclarecido. Além destes fatores, tem sido sugerido que outros agentes como vírus, fatores físicos e mecânicos, assim como carência no consumo de certos nutrientes como ferro e vitamina C, também podem participar na gênese desta neoplasia (Parise Jr, 2000; Moreno-López et al., 2000).

2.1.2.1 tabaco

Exploradores espanhóis introduziram na Europa no século XVI, o tabagismo. Desde o século XVIII, suspeitava-se da relação entre o carcinoma de boca e o tabagismo. Uso do tabaco, nas suas diversas formas, em várias regiões ao redor do mundo tem sido associado a um maior risco de desenvolvimento de carcinoma epidermoide de boca, ficando demonstrado em diversos estudos epidemiológicos que além do alto risco na aquisição desta patologia, há também que se considerar o

efeito dose resposta, demonstrando que o risco para indivíduos que interromperam o hábito de fumar declina progressivamente, atingindo após dez anos, o mesmo nível verificado para os não fumantes (Parise JR, 2000; Morse et al., 2007; Ide et al., 2008).

Moreno-López et al. (2000) relatam que um estudo realizado na Espanha observou que o risco do aumento da incidência do carcinoma epidermoide de boca relacionado ao uso do tabaco, crescia à medida que o seu consumo aumentava. Indivíduos que consumiam de 6 a 20 cigarros por dia o risco era de 3:1, enquanto os que consumiam acima de 20 cigarros diariamente este risco aumentava para 7.96:1, demonstrando claramente o efeito dose-resposta.

Segundo Parise Jr (2000) e Scully C, Field JK, Tanzawa H, (2000), é possível encontrar no fumo uma mistura complexa de aproximadamente 50 compostos já comprovadamente carcinógenos. Esses compostos podem ser basicamente divididos em três grupos distintos: as nitrosaminas (N-nitrosornicotina (NNN) e 4-methilnitrosoamino-1,3-pyridyl-1,1 butanone (NNK), os benzopirenos e as aminas aromáticas. As nitrosaminas estão predominantemente na fumaça produzidas pela queima do fumo, e os benzopirenos na forma de partículas, sendo estes compostos capazes de provocar mutações específicas como a transversão da guanina para timina. Entretanto estes compostos químicos presentes no tabaco são na realidade pró-carcinógenos. Diante dos fatos, foi proposto que os pro-carcinógenos precisavam sofrer alterações, até o momento do seu produto final se tornando um reagente eletrolítico, com deficiências de elétrons em determinadas regiões da molécula, com poder de estabelecer ligações mais estável, covalente, com as macromoléculas intranucleares do DNA, assim como ocorre com acetaldeído presente no álcool (Parise Jr, 2000; Scully C, Field JK, Tanzawa H, 2000).

As etapas enzimáticas envolvidas na ativação dos pro-carcinógenos derivados do fumo dependem basicamente da ação inicial de uma enzima de oxidação.

Sabe-se que é fundamental a participação das oxigenases do sistema citocromo p450, chamadas enzimas de fase I, presentes no retículo endoplasmático. Além da ação desse sistema, concorrem também as peroxidases. Sendo assim no caso dos benzopirenos, ao entrar na célula, estas moléculas sofrem ação de uma monoxigenase microssomal, originando 7, 8-epóxido, que é metabolizado novamente por enzima oxidativa em 7, 8-diidrodiol. Para tornar-se eletrofílico, é

novamente metabolizado e oxidado em 7, 8-diidrodiol-9, 10-epóxido, ou simplesmente descrito como um diol-epóxido. Este último é um agente preparado para reação covalente com um sítio do DNA. Essa reação se faz com o grupo 2-amino de resíduos da guanina. Essa região mutada passa então a ser uma alteração estável, denominada em inglês, de “adduct”, que seria “produto adicional” (Parise Jr, 2000; Scully C, Field JK, Tanzawa H, 2000).

Além desse carcinógeno final, produzido pela oxidação, podem ser produzidos durante a metabolização os chamados radicais livres que são moléculas que possuem elétrons não pareados tornando-os extremamente reativos capazes de produzir mutações por mecanismos complexos e podendo ser classificados em três grupos: os superóxidos, o oxigênio unimolecular e as hidroxilas (Parise Jr, 2000).

Assim, é de suma importância para o indivíduo exposto ao fumo e a outros carcinógenos/pró-carcinógenos que suas células da mucosa bucal sejam capazes de promover a detoxificação, ou melhor, de promover a anti-oxidação dessas moléculas preparadas para se ligarem ao DNA. Isto se processa por meio da ação das enzimas XME de fase II (do inglês, xenobiotic-metabolizing enzymes), ou apenas enzimas de fase II, encontradas principalmente no fígado e na mucosa do trato aerodigestivo superior, cujas funções são fortemente influenciada pelas respostas biológicas individuais. As enzimas glutathione-transferase (GST), superóxido-dismutase (SOD), N-acetyl transferase (NAT) e sulfotransferase são exemplos dessa classe de enzimas. Desta forma, indivíduos que possuem um sistema enzimático com grande eficiência na detoxificação das moléculas com alto poder de causar danos ao DNA, certamente gozam de uma capacidade maior de se manterem livres de neoplasias (Scully C, Field JK, Tanzawa H, 2000).

2.1.2.2 álcool

Podemos encontrar na literatura diversos estudos epidemiológicos que demonstram que o consumo de álcool age potencializando sobremaneira a capacidade que o fumo tem de induzir o carcinoma epidermoide de boca. Sabe-se que o etanol não é carcinogênico para células de animais cultivadas em laboratório, e, além disso o mecanismo pelo qual o álcool promove a carcinogênese oral não é

claro. Entretanto, ao utilizarmos estudos histológicos e de citologia esfoliativa do epitélio oral, o álcool parece participar do processo de proliferação celular tanto através de uma via intracelular e extracelular (Ogden, 2005).

O acetaldeído, derivado do metabolismo do álcool é considerada uma substância citotóxica e resulta na produção de radicais livres e na hidroxilação de bases de DNA, podendo ser considerada carcinogênica. De acordo com (Morse et al., 2007), o álcool pode interferir na nutrição e na biodisponibilidade de nutrientes essenciais, pode aumentar a penetração de substâncias carcinogênicas na mucosa oral, ou um aumento em sua permeabilidade, ou ainda atuar reduzindo as funções imunológicas do indivíduo. Existe ainda, a possibilidade do álcool de potencializar ou ativar agentes carcinogênicos, de interferir no reparo do DNA e finalmente de inibir a desintoxicação de carcinógenos.

2.1.3 Características clínicas

Os indivíduos acometidos de carcinoma epidermoide oral são de um modo geral mais velhos que perceberam alguma alteração na cavidade oral por cerca de quatro a oito meses antes de procurar ajuda profissional (8 a 24) meses entre os grupos sócio econômico mais baixo. Apresenta dor mínima na fase inicial de crescimento, o que justifica o retardo na procura por tratamento. Na sua apresentação clínica pode exibir forma exofítica, endofítica, leucoplásica, eritroplásica ou eritroleucoplásica. Os casos leucoplásicos e eritroplásicos provavelmente estão nos estágios iniciais da lesão. Essas lesões da superfície da mucosa quando adquirem fenótipo maligno, tendem a perder esta apresentação pelo desenvolvimento do carcinoma endofítico e exofítico (Neville et al., 2004).

Uma lesão exofítica possui tipicamente uma superfície irregular, fungiforme, papilar ou verrucosa, e uma cor que pode variar desde a coloração normal da mucosa adjacente até um aspecto eritematoso ou esbranquiçado, dependendo da quantidade de queratina produzida, da atrofia do epitélio ou da vascularização neoformada. A superfície pode apresentar-se ulcerada e as margens do tumor duro a palpação (Regezi et al., 2008). O padrão de crescimento endofítico é caracterizado por uma área central ulcerada, de forma irregular e deprimida, com uma borda

circundante "enrolada" de mucosa normal, vermelha ou branca. A borda da lesão resulta da invasão do tumor para baixo e lateralmente no epitélio adjacente (Neville et al., 2004). A destruição do osso subjacente, quando presente, pode ser dolorosa ou completamente indolor e aparecerá nas radiografias como uma radiolucidez *roído de traça* com margens mal definidas ou bordas irregulares (uma aparência similar à da osteomielite). O carcinoma também pode se estender por vários centímetros ao longo de um nervo (invasão perineural) sem rompê-lo para formar uma metástase verdadeira (Neville et al., 2004).

2.1.4 Características histopatológicas

O carcinoma epidermoide tem sua origem do epitélio displásico de superfície, ao exame histopatológico, pode-se observar ilhas e ninhos de células epiteliais neoplásicas poliédricas com citoplasma eosinofílico infiltrando um tecido conjuntivo subjacente. É possível a obtenção de cortes histológico nos quais podemos observar o tumor em estágios iniciais de invasão do tecido subjacente, casos nos quais os adjetivos superficialmente invasivos ou micro invasivos são normalmente utilizados (Neville et al., 2004).

A invasão é caracterizada pela extensão irregular do epitélio tumoral através da membrana basal para dentro do tecido conjuntivo. As diversas ilhas de células neoplásicas podem ser observadas como entidades separadas do epitélio de superfície podendo se estender profundamente para o tecido adiposo subjacente, para o músculo ou para o osso, destruindo o tecido original à medida que o tumor progride. As células neoplásicas podem destruir vasos sanguíneos e invadir o lúmen das veias ou vasos linfáticos. Frequentemente é possível observar uma intensa resposta inflamatória, assim como áreas focais de tecido necrótico (Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK, 2008).

Individualmente, as células epiteliais neoplásicas que invadiram o tecido conjuntivo subjacente além de exibirem citoplasma abundante com grandes núcleos, exibem também um significativo hiper cromatismo nuclear e uma perda da relação núcleo/citoplasma normal. Graus variados de pleomorfismo celular e nuclear também podem ser observados, assim como figuras de mitoses atípicas distribuídas

por todo o espécime em número variado. Células neoplásicas de algumas ilhas tumorais podem permanecer com sua capacidade de produzir queratina, dando origem a áreas focais redondas de células queratinizadas em camadas concêntricas conhecidas como pérolas de queratina ou pérolas córneas, que podem ser encontradas dentro do epitélio lesional (Parise Jr, 2000).

A graduação dos carcinomas epidermóides de boca refere-se ao grau de semelhança histopatológico que existe entre a neoplasia e seu tecido de origem. Baseado nisso, o carcinoma epidermoide de boca pode ser classificado em quatro estágios de diferenciação histológica, sendo que os tumores menos diferenciados recebem os números mais altos. Admite-se de certo modo que o grau de diferenciação dos tumores e consequentemente seus aspectos histopatológicos esteja correlacionado com o padrão de agressividade, ou seja, o comportamento biológico da neoplasia. Em outras palavras, um tumor maduro o suficiente para parecer com o tecido de origem parece crescer um pouco mais lentamente e metastatizar tardiamente, estes tumores são considerados de grau baixo, ou grau I ou bem diferenciado (Neville et al., 2004).

Por outro lado, tumor que apresente muito pleomorfismo celular e nuclear, alto índice de mitoses atípicas e que seja incapaz de produzir queratina pode ser tão imaturo que torna difícil a identificação de seu tecido de origem. Estas formas crescem rapidamente, metastatizam cedo e são chamados de alto grau II/IV ou pobremente diferenciado ou anaplásico. Um tumor com aparência microscópica entre os dois extremos é classificado como um carcinoma moderadamente diferenciado (Neville et al., 2004; Parise Jr, 2000).

2.1.5 Tratamento

O estadiamento clínico da doença guia o tratamento dos carcinomas epidermoide de boca, que consiste na excisão cirúrgica ampla (radical), radioterapia ou na combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia

2.2 Lesões potencialmente malignas e displasias epitelial

Grande parte dos carcinomas epidermóides orais são precedidos por alterações visíveis da mucosa oral (Pityage et al., 2008). Essas alterações podem variar, desde lesões de coloração branca a avermelhada, podendo ser planas ou rugosas. Tais lesões podem ser consideradas potencialmente malignas, devido ao fato de apresentarem alterações que apresentam maior probabilidade de desenvolvimento de um carcinoma epidermoide em comparação aos tecidos normais (Who, 1978). O maior potencial de transformação maligna destas lesões, observado clinicamente, tem sido corroborado pela presença de alterações cromossômicas, genômicas e moleculares similares as do carcinoma epidermoide invasivo (Warnakulasuriya S, Jhonson NW, Van der Wall I, 2007). Desta forma torna-se imperativo que deve ser dada ênfase à identificação de alterações das mucosas que, ocasionalmente, podem preceder o carcinoma epidermoide oral. Na cavidade oral, as doenças mais frequente associada ao carcinoma epidermoide são as leucoplasias, as eritroplasias, ou a combinação de ambas, as chamadas eritroleucoplasias (Neville et al., 2004).

Microscopicamente, essas lesões podem exibir displasia epitelial, que representa um diagnóstico histopatológico caracterizado por alterações celulares e distúrbios de maturação indicativo de malignização. O diagnóstico de displasia oral é muito frequente uma vez que o grau de transformação neoplásica destas lesões cancerizáveis tem variado de 15 a 75%. Consequentemente, presença ou ausência de displasia epitelial poderá servir como indicador na determinação da probabilidade que uma lesão cancerizável possui de se tornar um câncer, sugerindo desta forma, de que maneira este paciente deverá ser acompanhado e se o tratamento precoce deverá ou não ser instaurado (Morse et al., 2007).

2.2.1 Leucoplasia

A leucoplasia é considerada a lesão potencialmente maligna mais frequente na mucosa oral, com uma taxa de 2 a 5% de transformação maligna (Pityage et al.,

2008). Essa lesão é definida como uma placa branca que não pode ser caracterizada clínica e histologicamente como qualquer outra lesão branca, ou seja, é um diagnóstico de exclusão (Liu; Szanto, 2000).

Os critérios histológicos que avaliam as alterações celulares e teciduais presentes nestas lesões são baseadas em anormalidades relacionadas à atipia celular e a perda da maturação normal do epitélio, ocasionando alterações morfológicas e estruturais que denotam um potencial de malignidade. Tais alterações são denominadas displasias epiteliais (Pitiyage et al; 2008).

As displasias epiteliais são consideradas alterações precursoras dos carcinomas epidermóides orais. A transformação maligna varia bastante em lesões que apresentam displasias, com um índice em torno de 6 a 36%. A graduação histológica das displasias ainda é uma ferramenta importante como preditivo de transformação maligna, oferecendo bases para nortear a conduta clínica (Smith et al., 2009).

Sabe-se que a graduação histológica é imperfeita, no que tange a classificação do potencial de transformação maligna das lesões da mucosa oral, no entanto, ainda é um recurso indispensável (Warnakulasuriya S, Jhonson NW, Van der Wall I, 2007). A precisão dos métodos de graduação histológica das displasias é dependente da qualidade e quantidade suficiente de amostra tecidual, mesmo assim, esse sistema avaliativo tende a ser subjetivo, sujeito as variações entre diferentes avaliadores e entre diferentes momentos da avaliação do mesmo avaliador (Smith et al., 2009).

Já foi demonstrado que acúmulos de alterações genéticas são responsáveis pela transformação maligna. Na mucosa oral, isso reflete em uma série de mudanças que caracterizaram as displasias epiteliais. No entanto, a progressão de eventos genéticos envolvidos na transformação maligna não foi completamente elucidada. Ainda não se sabe o significado prognóstico da detecção precoce das alterações genéticas nos tecidos displásicos, contudo, observou-se que tais alterações estão presentes nestes epitélios displásicos e em tecidos marginais ao carcinoma epidermoide, sugerindo uma relação entre estas mutações no desenvolvimento das lesões potencialmente malignas, e consequentemente no desenvolvimento do carcinoma epidermoide (Warnakulasuriya et al., 2007).

Um número crescente de publicações vem abordando as possíveis alterações moleculares presentes nas lesões potencialmente malignas, e que esses achados,

podem representar uma base mais sólida no que tange a avaliação do prognóstico destas lesões.

2.2.2 Eritroplasia

O termo eritroplasia foi originalmente usado por Queyrat para uma lesão vermelha potencialmente cancerígena que se desenvolve no pênis. Na boca a eritroplasia é clínica e histologicamente semelhante ao processo que se desenvolve no órgão genital (Neville et al., 2004).

A eritroplasia é uma lesão caracteristicamente avermelhada que não pode ser diagnosticada como nenhuma outra lesão e que carrega consigo um maior risco de desenvolvimento neoplásico do que a leucoplasia, entretanto, é uma lesão mais raramente observada na mucosa oral. Seu pico de prevalência é estimado em um para cada 2500 adultos. A exposição ao tabaco em suas diversas formas também representa o seu principal fator etiológico e ao exame histológico geralmente observamos uma displasia severa ou mesmo um carcinoma in situ normalmente acompanhado de proliferação vascular e inflamatório linfocitário (Parise Jr, 2000).

A eritroplasia é uma condição patológica predominantemente de homens mais velhos, com uma média de 65 a 74 anos de idade. O soalho de boca, a língua e o palato mole são os sítios mais frequentemente afetados. A lesão macular eritematosa é normalmente assintomático e pode estar associado com uma leucoplasia adjacente (Neville et al., 2004).

2.2.3 Eritroleucoplasia

Ocasionalmente, poderemos observar lesões que se apresentam clinicamente como placas brancas e avermelhadas, as quais se dão o nome de eritroleucoplas.

As lesões cancerizáveis podem ser classificadas de acordo com o seu grau de displasia como leves, moderadas ou intensas, que utiliza como referência os mesmos princípios de classificação de lesões cancerizáveis do colo do útero e que foi adaptado com mínimas mudanças para outros sítios, como brônquios, laringe, mucosa oral (Parise Jr, 2000).

Segundo (Liu; Szanto, 2000), o percentual de leucoplasia que evolui para o carcinoma epidermoide de boca está diretamente relacionado com a severidade de displasia epitelial que a lesão apresenta, uma vez que lesões apresentando displasia leve a moderada apresentam em média 5% de transformação neoplásica, enquanto que naquelas que apresentam displasia severa podem obter níveis de transformação neoplásica de até 43% e que os locais de maior risco para transformação maligna das lesões cancerizáveis da são assoalho da boca e língua.

De acordo com Parise Jr, (2000), além das alterações básicas observadas nas lesões cancerizáveis como hiperplasia ou atrofia, e variações na quantidade e qualidade de queratina, acantose e hiperqueratose do epitélio, estas alterações celulares ou atípicas celulares incluem:

1 - Projeção epitelial em forma de gota: são projeções nas quais a porção terminal da projeção é mais ampla do que sua base.

2 - Polarização das células da camada basal: refere-se a disposição em paliçada e colunar assumida pelas células da camada basal.

3 - Hiperplasia da camada basal: devido as células imaturas apresentarem aspecto basalóide, a camada basal adquire aspecto aumentado. Estas alterações pode se estender por diversas camadas do epitélio.

4 - Pleomorfismo celular e nuclear: significa a variação da forma e do tamanho das células e núcleos com alteração da relação núcleo-citoplasma.

5 - Hiperchromatismo nuclear: representa uma variação tintorial mais intensa dos núcleos.

6 - Alteração das mitoses: é o aumento do número das divisões celulares e ocorrência de divisões anormais.

7- Perda da coesão: é a perda da união entre as células por alteração de suas junções.

8- Queratinização anormal: é a deposição de queratina individualmente ou em grupos de células abaixo da superfície.

- 9- Desta maneira, baseado na análise e interpretação histopatológica de qualidade e quantidade das atipias presentes, o conjunto delas será graduado como leve, moderado ou intenso.

2.3 Proteína ki-67

A replicação do DNA é um passo fundamental no ciclo celular, que deve ser coordenado com divisões celulares para certificar que as células filhas tem a mesma ploidia das células mãe. Em células eucarióticas, a replicação do DNA é iniciada a partir de um grande número de origens de replicação, mas eventos de iniciação devem ser restritos a uma vez por ciclo celular (Weinberg, 1995).

Fase ciclo de divisão celular, duas condições devem ser encontradas. Primeiro, o DNA deve ser duplicado somente no período específico para replicação do DNA no ciclo celular (fase S), que é claramente separado do período para segregação cromossômica e divisão celular (fase M). Segundo, todas as regiões do genoma devem ser duplicadas em um único ciclo celular, porém, nenhuma região deve ser replicada mais de uma vez (Shusuke; Blow, 1998).

Esta arquitetura nuclear sofre uma reorganização quando as células entram em mitose, no momento que a degradação da membrana nuclear age como um sinal de iniciação para uma drástica redistribuição de proteínas nucleares. A grande maioria destas proteínas é igualmente distribuída no citoplasma, ao passo que um grupo menor se associa aos cromossomos condensados em células mitóticas. Dentre as proteínas que se associam com os cromossomos, dois tipos diferentes foram reconhecidos: aqueles que apenas transitoriamente se associam ao cromossomo e aqueles que se mantêm associados ao cromossomo durante a mitose (Rattner et al., 1992).

Um subgrupo de proteínas, conhecido por ser associado a cromossomos mitóticos durante a mitose, localiza-se na região nucleolar nos componentes fibrilares densos do nucléolo durante a interfase (Rattner et al 1992). Entre essas proteínas se inclui o antígeno Ki-67 (Gerdes et al., 1983; Verheijen et al., 1989). A proteína Ki-67 é localizada predominantemente no córtex nucleolar e nos

componentes fibrilares densos do nucléolo durante a interfase, ao passo que durante a mitose, torna-se associada com a periferia dos cromossomos condensados (Isola et al., 1990; Verheijen et al., 1989). Tem sido sugerido que a proteína Ki-67 é associada com a matriz nuclear (Verheijen et al., 1989), com pré-ribossomos (Isola J, Helin H, Kalioniemi OP, 1990) ou com o DNA das células durante a interfase, assim como com o cromossomo de células mitóticas (Verheijen et al., 1989).

Quando se avalia a distribuição topográfica da proteína Ki-67 se nota que há uma dependência com o ciclo celular (Braun N, Papadopoulos T, Müller-Hermelink HK, 1988): na fase G1 o antígeno Ki-67 está predominantemente localizada na região perinucleolar, nas ultimas fases do ciclo celular, o antígeno é também detectado em todo o interior do núcleo, sendo predominantemente localizada na matriz nuclear (Verheijen et al., 1989). Na mitose, o antígeno Ki-67 está presente em todos os cromossomos (Gerdes et al., 1983) e aparece numa estrutura reticulada que envolve os cromossomos metafásicos (Verheijen et al., 1989). A imunomarcagem pelo Ki-67 diminui rapidamente durante anáfase e telófase. O antígeno é degradado com uma meia-vida biológica detectável de menos de uma hora, como estimado em células pós-mitóticas (Bruno; Darzynkiewicz, 1992). Em contraste com muitas outras proteínas associadas ao ciclo celular, o antígeno Ki-67 é consistente e ausente em células quiescentes e não é detectável durante os processos de reparação do DNA. Assim, a presença do antígeno Ki-67 é estritamente relacionada com o ciclo celular e confinada ao núcleo, sugerindo um papel importante desta estrutura, na manutenção e/ou a regulação do ciclo de divisão celular (Schlüter et al., 1993).

O antígeno Ki-67 foi originalmente identificado por Gerdes et al. (1983), usando um anticorpo monoclonal, de rato contra um antígeno nuclear de células derivadas do linfoma de Hodgkin, e que se mostrou ser exclusivamente expresso em células em proliferação. A utilidade deste anticorpo foi imediatamente reconhecida e hoje é comumente utilizada como marcador clínico para auxiliar no diagnóstico e prognóstico de tumores (Gerdes et al., 1991).

A sequência de RNAm humano de Ki-67 que codifica o antígeno do Ki-67 foi isolado e caracterizado e como resultado de um processo de splicing alternativo. Ficou demonstrado que codificam duas proteínas diferentes com massas moleculares de 359 kDa e 320 kDa Ki-67. Essas bandas foram exclusivamente

detectadas em células lisadas preparadas de tecido que experimentavam a proliferação celular, enquanto elas estiveram ausentes nos lisados obtidas das células quiescentes (Gerdes et al., 1991). O fragmento do gene contém sequências repetitivas de cerca de 300 pb, contendo uma sequência de 62pb que se repete em níveis muito elevados de homologia. Pois o menor fragmento descrito, neste papel, corresponde somente com esta sequência de 62pbe uma vez que está presente em todos os outros clones de DNA cisolados, até agora por immunocloning, supõe-se que essa sequência, ou partes dele, codificam padrão epítopo, que é detectado pelo Ki-67. Devido ao elevado peso molecular e a sequência até agora conhecida, o Ki-67 é distinto de outros antígenos de proliferação, tais como ciclina, p53, c-myc, ou de outros produtos relacionados com oncogenes (Gerdes et al., 1991). Os experimentos de digestão enzimática mostraram que este antígeno é altamente suscetível ao tratamento com protease e o antígeno não pode ser extraído por 0,1 HCl normal, indicando que o antígeno Ki-67 é uma proteína livre de histona (Schlüter et al., 1993; Starborg et al., 1996).

Apesar do antígeno Ki-67 ser amplamente usado para avaliar a capacidade proliferativa de neoplasias, no entanto, sua exata função celular não é conhecida (Starborg et al., 1996). As funções desta proteína na interfase ainda não estão claras, no entanto, três papéis possíveis durante a mitose têm sido sugeridos: pode estar envolvida na condensação e descondensação de cromossomos, na proteção e a estabilização de cromossomos, ou no mecanismo para a distribuição simétrica de proteínas nucleolares entre as células-filhas (Starborg et al., 1996).

Métodos imuno-histoquímicos utilizando o anticorpo monoclonal Ki-67 ,da subclasse IgG1, para determinar a proliferação celular, tem sido bem aceitos. O anticorpo Ki-67 reage com um antígeno nuclear que é expresso durante as fases G1, S, G2 e mitose, mas não durante G0 (Gerdes et al., 1983), porém uma das principais limitações da utilização de anticorpo monoclonal é a exigência de Ki-67 em tecido fresco ou congelado, porque a fixação promove manchas na maioria das vezes. Anticorpos mais recentes, policlonal Ki-67 e MIB1, criados contra peptídeos de fragmentos recombinantes do gene para o antígenoKi67, são eficazes nas secções convencionais após irradiação de microondas (Rose DSC, Maddox PH, Brown DC, 1994). MIB-1é um anticorpo murino monoclonal contra partes recombinantes do Ki-67 e pode ser usado em tecidos fixados em formalina e embebido em parafina. Uma boa correlação entre medições de Ki-67 e MIB-1 tem

sido relatada (Querzoli et al., 1996). Uma boa correlação entre o anticorpo Ki-67 e MIB-1 foi relatada (Gerdes et al., 1991; Schluter et al., 1993). As análises do ciclo celular detalhadas revelaram que MIB-1 é expresso em todas as partes ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), mas está ausente nas células em repouso, G0 como soe acontecer com o Ki-67 (Gerdes et al., 1983). Portanto, Ki-67 e MIB-1 são anticorpos monoclonais direcionados contra epítomos diferentes do mesmo antígeno relacionados à proliferação.

Van Dierendonck et al. (1989) demonstraram que o antígeno Ki-67 pertence a uma classe de antígenos associados com a organização estrutural de cromossomos em anáfase e metáfase e à proteínas situadas próximas à região cortical dos corpos pré-nucleares e do nucléolo. Utilizando a classificação tecnológica 5'-bromodeoxiuridina, os autores mostraram que a expressão não pode ser detectada no início da replicação do DNA. A comparação das frações de Ki-67 e dos fatores de crescimento estimados a partir das curvas 5'-bromodeoxiuridina de rotulagem contínua revelou que as frações de Ki-67 foram invariavelmente superiores aos fatores de crescimento: exponencialmente crescente nas células cancerígenas ovarianas, as frações de Ki-67 foram somente 3,4% mais elevadas do que os fatores de crescimento; nas células MCF-7. Além disso, a diminuição das células positivas para Ki-67 foi observada em nutrição desfavorecida. Os resultados indicaram que frações de Ki-67 nem sempre devem ser um indicador seguro para se associar com fatores de crescimento.

Uma avaliação da utilidade da proteína Ki-67 em neoplasias humanas pode ser observada na resposta de carcinomas de mama ao quimioterápico tamoxifeno. Tamoxifeno inibe a proliferação celular de tumores mamários, então quando a atividade proliferativa, medida através da expressão de Ki-67, é analisada após um curto período de tratamento, o resultado pode ser considerado uma abordagem razoável para predição da resposta. Quando pacientes são tratados com Tamoxifeno há uma queda na taxa de expressão de Ki-67 (Lima et al., 2003). A expressão de Ki-67 em tecido mamário normal diminui significativamente em pacientes recebendo 5, 10 ou 20 mg/dia de Tamoxifeno por 50 dias, comparado com grupo placebo. Conclui-se que os resultados indicam que biomarcadores mamários em pacientes em período de pré-menopausa se modificam com 5, 10 ou 20mg/dia de Tamoxifeno por 50 dias quando comparados com grupo placebo (Lima et al., 2003).

Outro estudo conduzido por Wynne et al. (2002) analisou a ação do quimioterápico tamoxifeno com o índice de proliferação em carcinomas de mama. O estudo randomizado mostrou que a diminuição de Ki-67, nos primeiros 14 dias de tratamento com tamoxifeno, foi relacionado à resposta clínica. A queda significativa ocorreu no marcador de proliferação Ki-67, após 2 e 12 semanas, com vorozole e tamoxifeno. Os resultados confirmaram a inibição da proliferação da célula tumoral, tanto a curto prazo e a longo prazo, com tamoxifeno.

Células mamárias com a idade passam a expressar receptor de estrógeno e a diminuir a capacidade proliferativa, fazendo com que seja muito raro células que expressem receptores de estrógeno e Ki-67 simultaneamente (ER/Ki-67) em lóbulos da mama morfológicamente normais na pré-menopausa. Apesar desta relação inversa, contudo, a proporção de células morfológicamente normais da mama que expressam receptores de estrógeno e Ki-67 passa a aumentar após a menopausa, atingindo uma média de cerca de 11% de células Ki-67. A proporção de células duplamente marcadas está correlacionada com o risco atribuível à neoplasia maligna (Balvinder et al., 1999). Lesão de baixo risco contém o menor percentual de células positivas duais, enquanto lesão de alto risco, contém o mais elevado nível. Isto sugere que a expressão dupla de ER e Ki-67 pode ser a manifestação de uma importante alteração molecular no início do desenvolvimento da neoplasia maligna da mama, e que a gravidade da alteração é um determinante principal de risco (Balvinder et al., 1999). Ainda em relação ao câncer de mama, apesar de estudos abrangentes examinarem a relação entre a apoptose e a sobrevida livre de doença e total, a apoptose não conseguiu emergir como um marcador de prognóstico independente em pacientes com câncer mama com nódulo negativo ou nódulo positivo (Liu; Szanto, 2000). Em contraste, os tumores de alta proliferação, como detectadas pela Ki67 ou MIB-1 têm sido em grande parte associados com a diminuição da sobrevida livre de doença e com a sobrevida total (Pinder et al., 1995; Brown et al., 1996; Railo et al., 1997; Wintzer et al., 1991). Há uma relação amplamente descrita entre o nível de proliferação celular e resposta à quimioterapia no tratamento neoadjuvante, afirmando observações pré-clínicas de alta proliferação, correlacionar-se a quimiossensibilidade (Bonetti et al., 1996; Chevillard et al., 1997; MacGrogan et al., 1997).

Para avaliar o significado prognóstico da fração de crescimento da proteína Ki-67 em linfomas de grandes células difusas (DLCL). Grogan et al. (1988)

estudaram 105 amostras congeladas de DLCL. A elevada atividade proliferativa, evidenciada pela expressão nuclear de Ki67, em células malignas mostrou-se ser um forte indicador da baixa sobrevida entre estes pacientes. Os 19 pacientes com Ki-67 maior que 60% tiveram uma sobrevida média de oito meses comparada com a sobrevida média de 39 meses para os 86 pacientes com Ki-67 menor ou igual a 60%. Os pesquisadores concluíram que a alta atividade proliferativa (Ki-67>60) é um fator independente permitindo laboratorialmente predição de provável consequência da DLCL.

2.4 Família das proteínas de manutenção do minicromossoma (MCM)

Nos últimos anos o mecanismo exato de regulação da síntese de DNA tem sido alvo de muitos estudos. Mecanismos moleculares que regulam a replicação do DNA em células humanas requerem a interação de vários componentes. Um maquinário proteico é necessário para iniciar o processo de duplicação do DNA, e tais proteínas podem representar potenciais marcadores de células em proliferação. Além disso, possuem a propriedade de indicar quais as células que têm o potencial de replicação. A família de proteínas Mcm (proteína de manutenção do minicromossoma) representa um desses componentes, cuja função e utilidade como um novo marcador de proliferação celular tem sido intensamente investigada nos últimos anos (Blow; Ge, 2008).

MCMs foram implicadas inicialmente como possíveis reguladores da replicação do DNA através da observação de que a proteína *S. cerevisiae* Cdc46 (Mcm5) acumula-se no núcleo na fase G1, mas rapidamente desaparece do núcleo no início da fase S. Similar observação foi feita para Mcm2, Mcm3 e Cdc47 (Mcm7). A ideia das proteínas MCMs funcionarem como um fator que permite a proliferação partiu de estudos que mostraram que a permeabilização do envelope nuclear é necessária para a cromatina na fase G2 reconquistar a competência para outro ciclo de replicação do DNA. Foi sugerido que o passo pré-replicativo torna a cromatina competente para iniciação da replicação do DNA. Este processo envolveria a ligação à cromatina de fatores “licenciadores” no fim da mitose, permitindo um único evento iniciador para origem da replicação na subsequente

interfase, após o qual o fator licenciador seria inativado. Foi postulado que o fator licenciador seria incapaz de cruzar a membrana nuclear durante a interfase. Em condições normais a licença para o DNA replicar ocorre somente após a membrana nuclear quebrar na mitose, com isso, a replicação do DNA é restrita somente a uma vez por ciclo celular. Análises posteriores mostraram que as proteínas MCM em células eucarióticas permanecem no núcleo na interfase e provavelmente possam cruzar a membrana nuclear durante a interfase. MCMs ao se ligarem a cromatina refletem seus envolvimento na reação licenciadora. Digno de nota, que no final da fase S até a mitose, MCMs não parecem estar associadas à cromatina. Durante mitose, MCMs permanecem excluídas da cromatina condensada e religa-se na telófase, antes da reformatação da membrana nuclear. Em células de mamíferos o deslocamento das proteínas MCM ocorre na fase S, sugerindo que a etapa de alongamento da replicação do DNA é necessária para o deslocamento dessas proteínas, fato consistente com o papel exclusivo de iniciador da replicação (Kearsey; Labib, 1998).

As proteínas Mcm correspondem a um grupo de 10 proteínas envolvidas na replicação do genoma. As proteínas Mcm2-Mcm7 fazem parte da família e atuam interagindo entre si. Essas seis proteínas estão envolvidas com a fase inicial de replicação do DNA (Maiorano et al., 2006). As subunidades do complexo Mcm2-Mcm7 foram identificadas pela primeira vez em leveduras de brotamento (*Saccharomyces cerevisiae*) por mutações em Mcm2, Mcm3 e Mcm5. Os genes restantes (Mcm4 e Mcm7) foram isolados como células mutantes do ciclo de divisão e, por fim, Mcm6 que foi encontrada em *Schizosaccharomyces pombe* e identificada como um mutante de segregação cromossômica (Bochmanet; Schwacha, 2009). Além destas, as proteínas Mcm8eMcm9, mais recentemente identificadas, foram acrescentados à família, presentes em organismos multicelulares. Por fim, As proteínas Mcm1e Mcm10, que apesar de terem participação na replicação do DNA, não fazem parte desta família e não possuem relação entre si (Maiorano et al., 2006).

Como mencionado anteriormente, as proteínas MCM atuam no início da replicação do DNA, e como a proteína Cdc6, estão ligadas à cromatina durante a fase G1, porém desgarram-se posteriormente durante a fase S e permanecem não ligadas até o fim da mitose. Esta associação periódica assegura que a origem de replicação aconteça no final da fase G1 e possa somente ocorrer uma vez durante a

fase S. Ligação de MCM à cromatina requer outras proteínas de iniciação como complexo de reconhecimento da origem (ORC, do inglês origin recognition complex), Cdc6. A regulação parece ser orquestrada pelas proteínas quinases Cdk2/cdc2 e Cdc7-Dbf4. A sequência de ligação à cromatina é: primeiro ORC, então Cdc6/cdc18 e finalmente MCMs. MCMs ligadas à cromatina são hipofosforiladas, necessitando, portanto de fosforilação, possivelmente patrocinada por Cdk2, para desligamento da cromatina. Uma vez ativado, o complexo funciona como uma helicase, separando o DNA em duas fitas simples para que ocorra a sua replicação (Tsuyama et al., 2005, Bowers et al., 2004; Maiorano D, Lutzmann M, Méchali M, 2006; Kearsey, Labib, 1998). Em *Saccharomyces cerevisiae*, este complexo é exportado do núcleo durante a fase S, pelo sinal de exportação nuclear (NES) mediado pela interação da proteína Mcm3 e S-CDKs (Liku et al., 2005). As proteínas Mcm8 e Mcm9, por sua vez, parecem estar mais associadas entre si do que com as proteínas Mcm2-7. Já a proteína Mcm8, assim como o complexo Mcm2-7, exerce papel de uma helicase de DNA e estimula sua síntese durante a fase S, na qual o complexo encontra-se fora do núcleo. Enquanto que Mcm9 ainda não teve sua função na síntese de DNA esclarecida (Gozuacik et al., 2003; Maiorano et al., 2006).

Em *S. cerevisiae*, pelo menos dois dos genes MCM (CDC46(MCM5), CDC47 (MCM7) são periodicamente transcritos no ciclo celular durante a mitose e na fase precoce de G1, e este controle é dependente do elemento promotor Mcm-1 (chamado de elemento precoce da caixa do ciclo celular- ECB do inglês early cell cycle box element). Apesar da transcrição periódica das MCMs, níveis de tais proteínas não parecem variar dentro do ciclo celular, o que presumivelmente reflete a estabilidade dessas proteínas. Condição semelhante é vista nas células de mamíferos, com níveis proteicos constantes durante o ciclo, porém, com pico na fase tardia de G1. Locais de ligação para a proteína E2F são encontrados nas regiões promotoras de genes MCM de mamíferos (Kearsey; Labib, 1998).

2.4.1 Relação das proteínas MCM com neoplasias malignas

Estudos de (Há et al., 2004) têm demonstrado que alterações na expressão do complexo Mcm2-7 é característica dos primeiros estágios da carcinogênese. Foi

demonstrado que a superexpressão destas proteínas contribui para o crescimento celular pelo aumento da taxa de transcrição ou pela interação com a proteína retinoblastoma (Busby-Earle et al., 1994). Portanto, as proteínas deste importante fator de iniciação da replicação de DNA podem ser utilizadas como marcadores de várias lesões potencialmente malignas (Liu et al., 2007). Proteínas *Mcm*, entretanto, são também expressas em células proliferativas normais. Porém, esta expressão parece ser menor em células normais do que em células malignas, sugerindo que a expressão destas proteínas é regulada diferentemente em cânceres quando comparada com células normais (Ha et al., 2004).

A partir disto, a relevância clínica das proteínas *Mcm* como marcadores proliferativos tem sido investigada, especialmente através da imuno-histoquímica, em diferentes neoplasias malignas. Por exemplo, em carcinomas de células não pequenas de pulmão (Ramnath et al., 2001), em carcinomas de próstata (Meng et al., 2001; Padmanabhan et al., 2004), em carcinoma epidermoide oral (Kodani et al., 2003), condrossarcoma (Helfenstein et al., 2004), em tumores gliais (Wharton et al., 2001), em carcinoma de células renais (Dudderidge et al., 2005), em câncer de mama (Gonzalez et al. 2003), em carcinoma endometrial (Li et al., 2005), assim como em neoplasias de tireoide (Guida et al., 2005).

A expressão de *Mcm2* foi detectada em cânceres da suprarrenal (Szajerka et al., 2008), de estômago (Giaginis et al., 2011) e cólon (Tokuyasu et al., 2008). Recentemente a expressão da proteína *Mcm2* foi comparada com a de biomarcadores já validados (Ki-67 e PCNA) em câncer gástrico. Os resultados mostraram que 90% das amostras expressaram *Mcm2*, enquanto que Ki-67 e PCNA expressaram 67% e 80%, respectivamente, demonstrando que *Mcm2* é um sensível, específico e efetivo biomarcador para o câncer gástrico, tendo potencial em uso clínico (Liu et al., 2013). Além desses tumores, as proteínas da família de *Mcm* também se revelaram potenciais marcadores de diagnóstico em meningiomas, um dos tumores do sistema nervoso central mais comuns (Saydam et al., 2010).

Entre as proteínas da família *Mcm*, a proteína *Mcm3* mostrou-se envolvida na tumorigênese de diversos tipos de câncer por facilitar as atividades gerais de replicação (Ha et al., 2004). Sua alta expressão está diretamente relacionada com um prognóstico ruim em pacientes com melanoma. Como o curso clínico desta neoplasia maligna é altamente variável, havia a necessidade de um marcador independente que apontasse o prognóstico desta lesão, e *Mcm3* foi fortemente

associado com quase todas as características desfavoráveis, clínicas e patológicas, da neoplasia (Nodin et al., 2012). Além disso, um estudo demonstrou que *Mcm3* foi detectada em linhagem de células de leucemia linfoblástica, linfoma de Burkitt, câncer cervical, leucemia promielocítica, leucemia mielóide crônica e câncer de cólon. Seu resultado revelou que esta proteína é expressa mais fortemente em tecidos de neoplasias malignas primárias, incluindo carcinomas de cólon, colo do útero, estômago, rim e de mama do que em suas contrapartes normais (Ha et al., 2004).

Em relação a outro integrante da família de proteínas MCM, em 2011, Kikuchi et al. observaram que a baixa regulação da proteína *Mcm4* reduziu a proliferação de células cancerígenas do pulmão, indicando que *Mcm4* desempenha um papel essencial na proliferação de algumas células malignas. O estudo também demonstrou que a expressão desta proteína foi maior em células cancerígenas do que em células normais.

Stoeber et al. (2002) concluíram que a detecção imunofluorométrica de *Mcm5* em sedimentos de urina é um sensível e específico teste para o carcinoma de bexiga, detectando-o em diferentes estágios e graus. A expressão de *Mcm5* mostrou-se associada a parâmetros clínico patológicos (tamanho do tumor, presença de metástase ou linfonodos palpáveis e estágio histopatológico) de adenocarcinoma gástrico. Ao lado disso, estudo conduzido por Giaginis et al. (2011) mostraram que pacientes que apresentavam alta expressão de *Mcm5* tiveram um curto período de sobrevida.

O estudo realizado por Gauchotte et al., em 2012, que objetiva avaliar o valor de marcadores envolvidos no ciclo celular como ferramentas que pudessem prever a recorrência em meningiomas, devido à falhas na detecção de meningiomas recorrentes de grau I, identificou a proteína *Mcm6* como o marcador mais eficiente para identificar tumores com um alto risco de recorrência. Esta proteína também mostrou-se relacionada com a proliferação de células tumorais em carcinoma de células de Merkel, uma neoplasia rara que se forma quando estas células, que se localizam na pele, e são relacionadas com o sentido do tato (Gambichler et al., 2009).

A desregulação da proteína *Mcm7* foi identificada em pacientes com carcinoma hepatocelular, sugerindo que sua expressão funciona como um indicador de prognóstico em pacientes com esta neoplasia maligna após a ressecção (Zhou et

al., 2012). Um estudo com o propósito de identificar potenciais biomarcadores para o prognóstico de pacientes que apresentavam câncer de pulmão de células não pequenas utilizando amostras de escovação brônquica, apontou a proteína Mcm7 como um marcador de um prognóstico pobre. Mcm7 em escovação brônquica também mostrou um valor prognóstico independente, que pode ser utilizado quando a realização da biópsia é inviável (Liu et al., 2012). Os resultados do estudo de Toyokawa et al. (2011), mostraram que a expressão de Mcm7 é significativamente alta em espécimes de câncer de pulmão, além de apresentar uma marcante expressão em câncer de bexiga e de fígado.

2.5 A Proteína p27

Em mamíferos, a progressão do ciclo celular é impulsionada pela ativação sequencial de complexos de ciclina-CDK. A atividade de CDK é regulada negativamente pela família de proteínas Cip/Kip e INK. A família Cip/Kip inclui os genes p21, p27 e p57 e a família INK os genes p18 e p19. Estes inibidores funcionam como supressores de tumor que se ligam aos complexos ciclinas/CDK-s e os inativam (Kudo et al., 2000).

As proteínas da família Cip/Kip apresentam uma atividade inibitória mais ampla, que afetam as quinases dependentes de ciclina A, D e E (Sherr; Roberts, 1999). Baseando-se no estudo da estrutura, acredita-se que uma α hélice das proteínas Cip/Kip interage com a ciclina e uma segunda hélice com a subunidade catalítica da CDK, provavelmente bloqueando o seu carregamento de ATP (Russo et al., 1996).

Descoberto em 1993, o gene p27 ou Kip1 localizado no cromossoma 12p13, é um inibidor de quinase dependente de ciclina, que regula negativamente a progressão da fase G1 do ciclo celular pela ligação ao complexo ciclina e quinase dependente de ciclina 2. p27 é uma proteína multifuncional e além de estar envolvida na regulação do ciclo celular, atua na transdução de sinal, diferenciação e adesão celular. Essa proteína é ativada em resposta a sinais extracelulares como inibição por contato, TGF- β e ciclina- AMP (Colombo; Rahal, 2009). Em células normais, durante a progressão do ciclo celular, os níveis máximos de p27 ocorrem durante a

fase G1 e na quiescência (G0) (Hengst; Reed, 1996). O aumento na concentração celular de p27 mediante a indução de quiescência celular ocorre principalmente devido a uma diminuição na taxa de sua degradação. Embora a expressão de p27 também seja regulada em níveis de transcrição e tradução, os níveis de p27 são principalmente regulados por proteólise ubiquitina-dependente.

A proteína p27 é poliubiquitinizada, e a via que conduz à sua degradação proteolítica é mediada pela ciclina E/CDK2 via fosforilação de treonina 187 (Thr187) (Alkarain A, Jordan R. Slingerland J, 2004; Boehm et al., 2002). Esta fosforilação, durante a fase tardia de G1 e precoce de fase S, facilita a interação da p27 com o complexo de ligase E3 Skp2-dependente, a qual em última análise conduz à sua degradação. Mais recentemente investigadores demonstraram que a fosforilação de Tyr88 por tirosina quinases oncogênicas podem facilitar a fosforilação de Thr187, conduzindo à sua degradação na transição de G1 - S (Grimmler et al., 2007).

Um dos mecanismos de controle que têm se dado bastante atenção é o transporte de p27/kip1 do núcleo para o citoplasma. Para exercer sua função como inibidor da atividade das Cdks, p27/Kip1 precisa estar localizada no núcleo. Esta proteína contém um sinal de localização nuclear (NLS) na região C terminal (Zeng et al., 2000). Eventos de fosforilação nesse domínio regulam a saída de p27/Kip1 do núcleo. Boehm et al. (2002) demonstraram que sob estimulação mitogênica a proteína nuclear Hkis, se liga no domínio C terminal de p27/Kip1 e fosforila o resíduo de Serina 10 promovendo sua exportação nuclear. Além disso, a fosforilação no resíduo treonina 157 do NLS por AKT impede a importação nuclear de p27/Kip1, promovendo o acúmulo desta proteína no citoplasma (Shin et al., 2002). Foi mostrado também que SRC fosforila p27 em Tyr74 e Tyr88, resultando em menos p27 nucleares devido a um acúmulo de p27 citoplasmática (Chu et al., 2007), a inibição farmacológica de SRC posteriormente restaura a função de p27.

Adicionalmente, estudos recentes indicam que a proteína Jab1 (do inglês human Jun activation domain-binding protein 1), a qual foi originalmente identificada como um coativador do gene AP-1, envolvido no controle da proliferação celular, participa também da degradação da proteína p27 via sistema ubiquitina-proteossoma, sendo a sua expressão inversamente associada com o nível de p27. Pesquisas indicaram, ainda, que a combinação de expressão aumentada de Jab1 e baixa expressão de p27 estão associadas com variáveis clínicas desfavoráveis como sobrevivência global e sobrevivência livre de doença baixa, metástase em

linfonodos em alguns tipos de neoplasias, dentre elas câncer de cabeça e pescoço (Dong et al., 2005).

A transformação de células normais em malignas é alcançada por um processo de múltiplas etapas associadas ao acúmulo de sucessivas alterações genéticas tanto em oncogenes quanto em genes supressores de tumor. A origem e a progressão do câncer podem ser causadas por anormalidades em vários reguladores (positivos e negativos) do ciclo celular. A progressão do ciclo celular é regulada positivamente por múltiplas ciclinas e quinases dependentes de ciclina, e negativamente por um número de inibidores de quinases dependentes de ciclina, incluindo p27 (Queiroz et al., 2009).

Um grande número de estudos tem demonstrado que níveis reduzidos da expressão de p27 em tecidos de câncer primário estão relacionados com redução de sobrevida e progressão da doença, assim como má resposta à quimioterapia. Correlações inversas entre o prognóstico do paciente e os níveis de p27 foram mostradas em mama, próstata, bexiga, pulmão, células gliais, fígado, laringe, ovários, estômago, e outros tecidos (Slingerland; Pagano M, 2000; Philipp SJ, Payne SR, Kemp CJ. p27Kip1, 2001; Lloyd et al., 1997).

Embora certos tipos de neoplasias, como AML e ALL, apresentem maiores deleções da área genômica em que p27 está localizado, nenhuma mutação somática de alelos foi identificada (Pietenpol et al., 1995). De um modo geral e, em forte contraste com outras proteínas supressoras de tumor, mutações somáticas no locus de p27 são muito raras em cânceres humanos. Uma exceção a esta regra é a recente descoberta de que uma linhagem de ratos, que exibe MEN (do inglês multiple endocrine neoplasia- neoplasia endócrina múltipla) mostrou uma mutação no locus p27 de rato, que leva a uma redução dos níveis de p27 em diferentes tecidos de rato. Curiosamente, os autores também identificaram um paciente humano com uma síndrome tipo MEN com uma mutação germinativa no locus p27. No entanto, este estudo é um raro exemplo de uma alteração genética do locus p27 (Pellegata et al., 2006).

A maioria dos estudos em que os níveis de expressão de p27 foram medidos em amostras de tumores humanos conclui que a redução de níveis de p27 é causada por um aumento da degradação de proteínas. Alguns estudos mostraram que, mesmo os tecidos de tumores que expressam baixos níveis de p27, como o carcinoma do cólon, linfoma das células do manto, câncer de pequenas células do

pulmão e outros, também apresentam um aumento na atividade degradadora de p27 (Nickeleit et al., 2007).

Dados de correlação de amostras cancerosas humanas em que o número de células que expressam p27 foi determinado por coloração imunológica é agora suportada por um grande número de estudos com camundongos. Perda de p27 em camundongo apenas confere um fenótipo de tumor relativamente ameno, levando ao desenvolvimento de adenomas pituitários e hiperplasia da próstata, com o aumento da idade (Fero et al., 1996; Nakayama et al., 1996; Kiyokawa et al., 1996). No entanto Fero et al. (1996) demonstraram que camundongos p27 knockout têm uma sensibilidade muito maior para o desenvolvimento de cânceres, após tratamento com carcinogêneos químicos ou irradiação. O estudo também mostrou que a perda de um único alelo p27 é suficiente para aumentar o número total de tumores que surgem e que reduz o tempo de sobrevivência total do rato afetado. Estes estudos iniciais foram seguidos por um grande número de experiências em que a contribuição da perda de p27 para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer em modelos de camundongos foi avaliada.

A perda de p27 em camundongos PTEN heterozigóticos leva a um grande aumento da incidência de lesões precursoras que podem progredir para carcinoma in situ ou mesmo carcinomas invasivos da próstata, enquanto que camundongos PTEN com p27 intacto desenvolvem lesões menos precursoras que não evoluem para estados mais malignos (Di Cristofano et al., 2001). Resultados semelhantes foram encontrados em modelos de câncer de hipófise, linfoma, câncer testicular e outros (Berns et al., 2000; Cipriano et al., 2001). Em geral, estes estudos realçam o fato de que uma redução de níveis de p27 promove o desenvolvimento do tumor alimentado pela maioria, mas não por todos, os eventos oncogênicos.

Nos carcinomas de células escamosas epidermóides de boca (CEB), diversos estudos relataram que a regulação negativa da proteína p27 é frequentemente observada (Kudo et al., 1998; Fujieda et al., 1999; Ito et al., 1999; Mineta et al., 1999; Venkatesan et al., 1999; Kuo et al., 2002; Shintani et al., 2002; Choi et al., 2003). Entre estes estudos, a regulação negativa da proteína p27 é correlacionada com prognóstico pobre nos carcinoma epidermóides estudados. Além disso, uma correlação estatisticamente significativa entre a diminuição da regulação da proteína p27 e prognóstico ruim foi observado em todos os estudos que mostraram

correlação entre a redução da expressão de p27 e metástase (Mineta et al., 1999; Kuo et al., 2002).

A natureza da relação entre a p27 e a metástase é ainda desconhecida, mas sabe-se bem que o nível e atividade de p27 são elevados nos contatos célula-célula de células epiteliais. Também foi relatado que a regulação negativa de p27, em células esferoides EMT-6 de tumor mamário, reduz a adesão intercelular e aumenta a proliferação celular (St Croix et al., 1996). Estas descobertas sugerem que a diminuição da regulação da proteína p27 em cânceres pode promover metástases assim como proliferação celular. No entanto, mais estudos são necessários para entender este mecanismo.

Um estudo mostrou que a regulação negativa da proteína p27 foi frequentemente encontrada em amostras de CEB invasivo precoce (limitado à área de mucosa ou submucosa sem invadir o músculo subjacente ou tecidos ósseos) (Kudo et al., 2000). Vários grupos também encontraram que a expressão reduzida de p27 foi observada em displasias graves epiteliais e que a expressão de p27 diminui com a progressão do CEB (Shintani et al., 2002; Choi et al., 2003; Kudo et al., 2000; Schoelch et al., 1999). Estes resultados indicam que a redução da proteína p27 ocorre na fase inicial do CEB.

3 PROPOSIÇÃO

O propósito deste estudo foi avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas Ki-67, MCM3 e P27 em leucoplasias orais, com diferentes graus de displasias epitelial (leve, moderada e intensa), e em carcinomas epidermóides de boca com objetivo de sugerir a participação dessas proteínas na aquisição do fenótipo maligno.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este capítulo está dividido de acordo com as etapas desenvolvidas na pesquisa.

4.1 Amostras dos Tecidos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de São Paulo sob o número 320.549 (Anexo A). As amostras foram selecionadas do Serviço de Patologia Cirúrgico Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e do Serviço de Patologia Oral do Hospital Universitário João de Barros Barreto. Os espécimes foram selecionados de 37 pacientes, 21 homens e 16 mulheres, com leucoplasias que continham displasias, idades variando de 42 a 68 anos. Onze amostras de mucocelo de soalho bucal que apresentavam inflamação distante do epitélio foram utilizadas como controle (mucosa normal) e 50 amostras de carcinomas epidermóides de soalho e língua, 38 homens e 12 mulheres, idade variando de 52 a 85 anos, de pacientes não tratados foram incluídas neste estudo. As amostras foram submetidas ao processamento histológico de rotina e coloração de hematoxilina e eosina. Baseado nos critérios da Organização Mundial de Saúde, que tipifica as lesões pré-malignas, foram encontrados, 13 amostras de displasias leves, 12 de displasias moderadas e 12 de displasias intensas.

4.2 Reações Imuno-histoquímicas

Para as reações foi utilizada a técnica da estreptavidina-biotina e os cortes submetidos aos anticorpos anti-MCM3, anti-ki67, e anti-p27. Para realização desta metodologia foram preparados, a partir do material embocado em parafina, cortes

de 3 μ m de espessura dos espécimes teciduais, estendidos em laminas de vidro previamente tratadas com organosilano para o aumento da adesividade entre o corte tecidual e a lamina. Após essa etapa, os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, sendo um a 60°C por 30 minutos, e outro em temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanóis, passando por três banhos de etanol absoluto, etanol a 95%, 90%, 85% e 80% por 3 minutos cada. Após a reidratação foi realizada a remoção do pigmento formólico através de banhos em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%), por 5 minutos.

Posteriormente, os cortes foram imersos em água destilada por 10 minutos, seguido por mais duas lavagens com água destilada. Após essa etapa, os cortes receberam tratamento para recuperação antigênica. Para esse tratamento, os cortes foram mergulhados em uma solução de ácido cítrico monoidratado 10mM, pH 6.0 em microondas por 15 minutos, dividido em três ciclos de 5 minutos cada. Ao final da recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados durante 10 minutos em água destilada, seguida de mais duas lavagens, para posteriormente ser realizada a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual.

O bloqueio da peroxidase endógena foi efetuado através da imersão das lâminas, por duas vezes, em uma solução na proporção de 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol por 15 minutos cada. Em continuidade, repetiu-se a lavagem em água destilada, seguida pela imersão dos cortes por três vezes em solução de Tris pH 7.6, por 5 minutos. Em seguida foi realizado a incubação dos anticorpos anti-MCM3(Dako, clone 101, Carpinteria, CA, EUA), anti-ki67 (Spring Bioscience, clone 3064, Pleasanton, CA, EUA), e anti-p27 (Biogenex, clone dcs72, San Ramon CA, EUA), nas respectivas diluições 1:100, 1:400 e 1:200, durante 18 horas à 4°C.

Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi utilizado o sistema do kit ADVANCE (DAKO, Carpinteria, CA, USA) seguindo as normas do fabricante. As reações foram reveladas através da incubação por 10 minutos com a substância diaminobenzidina (Liquid DAB+, K3468, DAKO, Carpinteria, CA, USA). Em seguida, os cortes foram lavados com Tris e água deionizada para remoção de excessos da substância de revelação, seguida pela realização de contracoloração com hematoxilina de Mayer.

Todas as reações imuno-histoquímicas deste estudo foram realizadas utilizando-se controles positivos e negativos. Nos casos submetidos a investigação da expressão de MCM3 e Ki-67 foi utilizado como controle positivo um espécime de adenocarcinoma de mama metastático. No caso da p27 foram utilizadas amostras de epitélio normal da mucosa oral. O controle negativo foi realizado omitindo-se apenas o anticorpo primário da reação em questão. Após a conclusão das reações os cortes foram desidratados em cadeias ascendentes de etanóis, diafanizados em xilol e montados com lamínulas.

4.3 Análise da Imunomarcação

Os espécimes submetidos às reações de imuno-histoquímica foram avaliados por um sistema de pontuação semi-quantitativa com o intuito de reduzir possíveis distorções relacionadas com a heterogeneidade das amostras. As lâminas foram observadas em microscópio de luz com aumento final de 400x sob um foco fixo e com clareza de campo e em cada lamina foram contadas 500 células em 3 campos representativos.

Esta avaliação levou em consideração quatro categorias que estimam a proporção de células positivas (<5% 0, entre 5% e 25% 1; entre 26% e 50% 2; acima de 50% 3). A imunomarcação dos três anticorpos foi considerada positiva quando localizada no núcleo e em todos os estratos do epitélio.

As expressões destes três marcadores foram avaliadas por dois patologistas independentes, sem acesso a maiores informações dos casos analisados. Na ocorrência de discordâncias entre os resultados avaliados, os casos discordantes foram analisados novamente pelos mesmos patologistas para obtenção de um julgamento final sobre o resultado do caso em questão.

4.4 Análise Estatística

As variáveis principais dos resultados deste estudo foram a proporção de marcação pelo processo de imuno-histoquímica das proteínas p27, ki-67 e MCM3 nos grupos de lesões observadas (carcinoma, displasia leve, displasia moderada, displasia intensa e mucoccele).

A partir da análise dos dados pelo Teste D'Agostino de Normalidade, verificou-se distribuição normal nos grupos analisados somente na variável de marcação da proteína ki-67. Entretanto, observou-se heterocedasticidade (variâncias desiguais), sendo utilizado o teste Não-paramétrico de Kruskal-Wallis para a análise das variáveis do estudo com o Método de Dunn para comparação entre as médias dos grupos.

A correlação entre os valores de marcação das proteínas por grupo de lesões foi verificado em gráfico dispersão bivariada. Foi utilizado o Teste de Correlação Linear de Pearson e obtidos os coeficientes de correlação (r). O erro tipo alfa (nível de significância) adotado foi de 0,05 para todas as análises estatísticas.

5 RESULTADOS

Assim como o capítulo de revisão de literatura e material e métodos o resultado foi dividido em parte de acordo com a pesquisa desenvolvida.

5.1 Proteína Ki-67

Em mucosa normal a imunomarcacão de Ki-67 limitou-se a camada basal e para basal, a medida que a displasia progredia aumentava a imunomarcacão nas camadas mais altas do epitélio. Os maiores índices de marcação sendo observados em carcinomas epidermóides de boca (Figura 5.1).

Figura 5.1- Expressão imuno-histoquímica da proteína Ki-67 em mucosa normal (A), displasia leve (B), displasia moderada (C), displasia intensa (D) e carcinoma epidermoide (E) (400x)

Na Figura 5.2 os resultados em relação à avaliação da proteína Ki-67 mostrou resultado estatisticamente significativo quando as amostras de mucocoele foram comparadas tanto com os casos que apresentavam displasia moderada e intensa como com aqueles que continham amostras de carcinomas. Entre as displasias foi observado resultado estatisticamente significativo quando as amostras com displasia leve foram correlacionadas com as de carcinomas.

* $p < 0.05$ em relação à Displasia Moderada e Displasia intensa

** $p < 0.01$ em relação ao Carcinoma

*** $p < 0.001$ em relação ao Carcinoma

Figura 5.2- Análise de Ki-67 em mucosa normal, displasia leve, moderada e intensa e em carcinomas

5.2 Proteína MCM3

O menor índice de marcação foi observado em mucosa normal. O índice de marcação aumentava com a progressão das displasias. O maior índice de

expressão foi verificado na displasia intensa, chegando a ficar ligeiramente maior que o índice encontrado nos carcinomas epidermóides, conforme mostra a Figura 5.3.

Figura 5.3 - Expressão imuno-histoquímica da proteína MCM3 em mucosa normal (A), displasia leve (B), displasia moderada (C), displasia intensa (D) e carcinoma epidermoide (E) (400x)

À avaliação da expressão da proteína MCM3 mostrou resultado estatisticamente menor quando os casos de mucocoele e de displasia leve foram comparadas com o grupo que continha às amostras de carcinomas. Outro resultado estatisticamente significativo menor foi observado quando os casos com displasia leve foram correlacionados com os que continham displasia intensa (Figura 5.4).

** $p < 0.01$ em relação à Displasia Intensa

*** $p < 0.001$ em relação à Displasia intensa e Carcinoma

$p < 0.001$ em relação ao Carcinoma

Figura 5.4 - Análise de MCM3 em mucosa normal, displasia leve, moderada e intensa e em carcinomas

5.3 Proteína p27

O maior índice de marcação foi observado na mucosa normal e o menor em carcinomas epidermóides de boca. Surpreendentemente a expressão aumentou à medida que a displasia progredia, conforme mostra a Figura 5.5.

Figura 5.5 - Expressão imuno-histoquímica da proteína p27 em mucosa normal (A), displasia leve (B), displasia moderada (C), displasia intensa (D) e carcinoma epidermoide (E) (400x)

Com relação à avaliação da expressão da proteína p27 os resultados foram estatisticamente menores quando os casos de carcinoma foram correlacionados com as amostras que continham mucosa normal, displasia leve, displasia moderada e displasia intensa (Figura 5.6).

*** $p < 0.001$ em relação à Mucocoele, Displasia Moderada e Displasia intensa

Figura 5.6 - Análise de p27 em mucosa normal, displasia leve, moderada e intensa e em carcinomas

5.4 Proporção de Marcação das Proteínas p27,ki-67 e MCM3 em Carcinomas

Em relação a avaliação das proteínas nas amostras de carcinoma, houve correlação entre a proteína MCM3 e p27, Ki-67 e p27 e MCM3 e Ki-67, conforme mostra a Figura 5.7.

Figura 5.7 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27, ki-67 e MCM3 em lesões de Carcinoma

5.5 Proporção de Marcação das Proteínas p27, Ki-67 e MCM3 em Displasias leves

Em relação a avaliação das proteínas nas amostras de displasias leves, não houve correlação entre as proteínas (Figura 5.8).

Figura 5.8 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27, ki-67 e mcm-3 em lesões de Displasia Leve

5.6 Proporção de marcação das proteínas p27, Ki-67 e MCM3 em displasias moderadas

Em relação a avaliação das proteínas nas amostras de displasias moderadas, houve correlação entre as proteínas MCM3 e p27.

Figura 5.9 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27, ki-67 e mcm-3 em lesões de Displasia Moderada

5.7 Proporção de marcação das proteínas p27, Ki-67 e MCM3 em displasias intensas

Em relação a avaliação das proteínas nas amostras de displasias intensas, não houve correlação entre as proteínas Ki-67, MCM3 e p27, conforme Figura 5.10.

Figura 5.10: Correlação da proporção de marcação das proteínas p27, ki-67 e mcm-3 em lesões de Displasia Intensa

5.8 Proporção de Marcação das Proteínas p27, Ki-67 e MCM3 em Mucosa normal

Em relação a avaliação das proteínas nas amostras de mucosa normal, houve correlação entre a proteína MCM3 e p27, Ki-67 e p27 e MCM3 e Ki-67 (Figuras 5.11 a 5.14).

Figura 5.11 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27, ki-67 e mcm-3 em lesões de Mucosele

Figura 5.12 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27 e ki-67 nas lesões bucais

Figura 5.13 - Correlação da proporção de marcação das proteínas p27 e mcm-3 nas lesões bucais

Figura 5.14 - Correlação da proporção de marcação das proteínas ki-67 e mcm-3 nas lesões bucais

6 DISCUSSÃO

Leucoplasia é a principal lesão potencialmente maligna de boca, com índices de evolução para carcinomas epidermóides apresentando grandes variações (Kushner et al., 1997; Scheifele; Reichart, 2003; Warnakulasuriya et al., 2007; Napier; Speight, 2008). Em função da leucoplasia frequentemente desenvolver displasia epitelial, o grau de displasia observado nas lesões leucoplásicas ser proporcional ao risco de desenvolvimento de carcinoma e das alterações displásicas usualmente serem encontradas em áreas adjacentes ao local de transformação maligna, tal alteração morfológica epitelial tornou-se o principal método avaliativo para estimar o risco de transformação para carcinoma epidermoide de boca (Kushner et al., 1997; Kurokawa et al., 2003; Hafian et al., 2004; Nasser et al., 2011; Kumar et al., 2012;). O critério preconizado pela Organização Mundial de Saúde para classificar as displasias epiteliais bucais é subjetivo, apresentando muitas regras histológicas de atipia celular e de alterações morfológicas, permitindo, por isso, variação entre diferentes observadores. Ao lado disso, a avaliação é dependente de alguns fatores, como grau de inflamação e local da biópsia (Kurokawa et al., 2003; Tabor et al., 2003; Dietrich et al., 2004; Takeda et al., 2006; Angiero et al., 2008; Ribeiro et al., 2012). Oportuno mencionar ainda, por fim, que apesar das atipias celulares que compõem a displasia epitelial quase sempre antecederem o aparecimento do carcinoma, a presença de displasia possui apenas valor limitado em prever o risco de cada paciente (Tabor et al., 2003; Takeda et al., 2006; Kumar et al., 2012).

A falta de uniformidade em estimar o risco da leucoplasia incentivou vários pesquisadores a buscarem marcadores moleculares que auxiliassem a prever o potencial de transformação maligna dessas lesões (Raju et al., 2005; Angiero et al., 2008; Pontes et al., 2009; Kumar et al., 2012; Pontes et al., 2013). Abordagens contemporâneas que propiciem um melhor entendimento molecular da carcinogênese envolvem diferentes aspectos genéticos, citogenéticos e epigenéticos, da regulação da expressão de genes. Analisados em conjunto, esses aspectos podem ajudar a entender a patogênese do carcinoma e desse modo melhorar o entendimento do risco de transformação maligna da leucoplasia (Tabor et al., 2003; Nasser et al., 2011). Este estudo avaliou a imunoexpressão das proteínas Ki-67, p27 e MCM3 em leucoplasias com vários graus de displasias e em

carcinomas epidermóides de boca, com o objetivo de analisar a utilização dessas proteínas como indicador da aquisição do fenótipo maligno das leucoplasias.

As proteínas deste estudo foram escolhidas pelas seguintes razões: Ki-67 é uma proteína não histona que é expressa em todas as fases do ciclo celular, começando a ser expressa no final da fase G1, porém apresenta máxima expressão nas fases G2 e M (Kurokawa et al., 2003; González-Moles et al., 2010; Kumar et al., 2012). Ki-67 não diferencia, entre as células proliferantes quais estão caminhando para a diferenciação. As proteínas MCM formam um complexo pre-replicativo por ligação a cromatina. Este complexo é montado no final da fase G2 e é dissociado no início da fase S, permitindo a replicação do DNA uma vez por ciclo. Digno de nota é que as proteínas MCM estão presentes somente durante o período supracitado do ciclo celular, desaparecendo em outras fases do ciclo, o que equivale dizer que elas não são expressas durante a quiescência e na diferenciação celular (Freeman et al., 1999; Chuang et al., 2012). Ao lado disso, Endl et al., (2001) ao investigarem a expressão das proteínas Ki-67, MCM3 e p27 na mucosa oral concluíram que p27 foi associada às células diferenciadas, enquanto Ki-67 e MCM3 foram predominantemente localizadas em áreas de proliferação celular. Outro resultado importante foi a observação de que as células que apresentavam parada no crescimento deixaram de expressar Ki-67, porém observou-se um atraso na diminuição nessas células da expressão de MCM3 e perda da expressão de p27. Do exposto os autores concluíram que a proteína MCM3 é expressa em células que cessaram a proliferação, pela ausência de Ki-67, mas que não estavam sofrendo diferenciação terminal, devido a ausência da expressão de p27.

Portanto células que não expressam Ki-67 ou p27, mas expressam MCM3 representam células que dependendo do ambiente celular podem entrar no ciclo, acompanhada pela indução de Ki-67, como podem entrar em diferenciação terminal, com aumento da expressão de p27. Em última análise os pesquisadores inferiram que a análise da expressão isolada de MCM3 deve ser vista com cautela, porém a avaliação conjunta das proteínas MCM3, ki-67 e p27 pode fornecer dados mais precisos sobre as células que estão proliferando, quais estão quiescentes e quais estão se diferenciando. Do exposto se deduz, que a escolha de duas proteínas marcadoras de proliferação, Ki-67 e MCM3, que atuam em fases diferentes do ciclo celular se torna importante para auxiliar no entendimento do papel da proliferação celular durante a progressão das lesões displásicas para o carcinoma epidermoide

de boca. Já a proteína p27, que possui uma ação supressora tumoral, tem sido investigada em muitos estudos sobre as displasias orais, sem, entretanto, haver um consenso sobre a partir de qual etapa de aquisição do fenótipo maligno ela passa a ter sua expressão significativamente reduzida (Schoelch et al., 1999; Shintani et al., 2002; Kovesi; Szende, 2006;), ao lado disso é importante avaliar a correlação de p27 com Ki-67 e MCM3 para mensurar o papel destas associações na aquisição do fenótipo maligno do carcinoma epidermoide oral a partir de lesões displásicas. Para o melhor de nosso conhecimento este é o primeiro estudo avaliando as três proteínas MCM3, Ki-67 e p27 em lesões displásicas e em carcinomas epidermóides de boca.

Em nossa avaliação a imunoexpressão de Ki-67 não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os graus de displasias quando comparados entre si. Quando se correlacionou as amostras com displasias, com as de carcinomas, houve aumento estatístico significativo na expressão de Ki-67 somente quando as amostras de carcinomas foram comparadas com as que apresentavam as displasias leves. Nossos resultados são corroborados pelos estudos de Raju et al. (2005) e Nasser et al. (2011) que não encontraram também diferenças estatisticamente significantes entre a imunomarcagem de Ki-67 entre as lesões displásicas. Nossos achados estão em consonância também com os encontrados por Vered et al. (2009). Esses pesquisadores ao avaliarem a expressão de Ki-67 em lesões orais displásicas e em carcinomas de língua, encontraram diferença significativa quando o grupo de carcinomas foi comparado as amostras com displasia leve.

Nós inferimos, ainda, que os grupos que apresentavam displasia moderada e intensa e o grupo que continha os carcinomas apresentaram expressão significativamente maior na expressão de Ki-67 quando estas amostras foram comparadas com as que tinham a mucosa normal. Angiero et al. (2008) também encontraram resultados semelhantes aos nossos. Esses pesquisadores encontraram diferenças estatisticamente significantes quando o grupo que apresentava mucosa normal foi correlacionado com o que continha displasia moderada e intensa, assim como não encontraram diferenças estatísticas entre o grupo com displasia moderada e intensa quando correlacionaram com as amostras de carcinoma. Angiero et al. (2008) utilizaram uma metodologia de avaliação diferente da que empregamos neste estudo. Eles definiram como negativa a imunomarcagem restrita ao terço inferior do epitélio, enquanto em nosso estudo consideramos positiva a

expressão observada em todas as camadas epiteliais, por entender ser válido observar o índice de marcação também das camadas basal e parabasal, metodologia, essa, também empregada por outros pesquisadores (Takeda et al.; 2006; Nasser et al., 2011; Kushner et al., 1997; Kurokawa et al., 2003; Hafian et al., 2004; Tabor et al., 2003). Nessa linha de pensamento convém mencionar a assertiva de Gonzáles–Moles et al. (2010) que, hipoteticamente, um grupo de células proliferantes da camada basal pode representar um alvo para evento oncogênico inicial posterior que poderia gerar subclones de células com capacidade invasiva.

Ribeiro et al. (2012) e Takeda et al. (2006) apesar de aplicar uma avaliação da imunomarcação que levou em consideração as camadas basal e parabasal encontraram resultados discordantes dos nossos. Takeda et al. (2006) inferiram que havia diferença estatisticamente significativa quando as lesões com displasias intensas foram comparadas com o grupo de carcinoma. Ribeiro et al. (2012) por fim não encontraram diferenças estatisticamente significantes na expressão de Ki-67 quando comparou o grupo com leucoplasias com e sem displasia. Algumas teorias nos são possíveis hipotetizar para a divergência dos resultados. Entre elas a influência do consumo de tabaco pelos pacientes e a localização da lesão, fatores que reconhecidamente exercem ação sobre o desenvolvimento das leucoplasias (Kushner et al., 1997; Gümüş et al., 2008), ou ainda, o sistema de score de avaliação diferentes utilizados.

Em última análise e baseado em nossos achados é lícito afirmar que a imunoexpressão de Ki-67, quando avaliada isoladamente, é um indicador pouco útil para diferenciar as lesões displásicas entre si. Sobre esse tema Gonzales-Moles et al. (2010) afirmaram que a proteína Ki-67 fornece uma informação limitada em razão de marcar a fração total de células em proliferação, isto é, todas as células que estão no ciclo celular. Isto fornece um campo de informação limitado, desde que reflete situações biológicas diferentes que possuem, portanto, implicações distintas no destino final, o que equivale dizer que Ki-67 também marca as células proliferativas que sofrerão diferenciação terminal, portanto, células que não desenvolverão o fenótipo maligno. Ao lado disso, a expressão de Ki-67 pode aparecer também quando a síntese de DNA é bloqueada ou em células sofrendo apoptose (van Oijen et al., 1998).

Durante o ciclo, a função das ciclinas é ativar as CDKs (quinases dependentes e ciclina), e seus níveis diminuem após executarem suas funções.

Entre as quinases que regulam a progressão da fase G₀ para G₁, estão as CDK4 e CDK6, que são ativadas pela associação com ciclina D. Já a formação do complexo ciclina E/CDK2 permite a entrada na fase S. A atividade do complexo ciclina/CDK é regulada por inibidores de CDK. Há duas principais categorias de inibidores: a família Cip/kip, que possui nas proteínas p21^{cip1}, p27^{kip1}, e p57^{kip2} as quais se ligam e inibem vários complexos ciclina/cdk, incluindo ciclina A,E e D associadas as quinases, e a família dos inibidores de cdk4 (INK-4/ARF), que tem nas proteínas p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p18, p19 e p14, os quais regulam negativamente a ciclina D associada as cdk4 e 6. Esses inibidores estão frequentemente alterados em neoplasias. p27 inibe o complexo ciclina E/CDK-2, promovendo parada do ciclo no ponto de restrição em G₁/S. Níveis de p27 estão normalmente elevados em células quiescentes e caem rapidamente após estímulos mitogênicos. A baixa regulação de p27 tem sido associada com o pior prognóstico em pacientes com vários tipos de carcinomas, incluindo carcinomas epidermóides de boca. Não está claro, entretanto, qual estágio da carcinogênese oral a diminuição da expressão desta proteína ocorre (Queiroz et al., 2010; Shintani et al., 2002; Todd et al., 2002; Jordan et al., 1998).

Shintani et al. (2002) e Jordan et al. (1998) analisaram a expressão de p27 em tecido normal, em lesões com displasias leve, moderada e intensa e em carcinomas epidermóides de boca. Os resultados encontrados por esses autores foi uma menor expressão de p27 em carcinomas. Resultado semelhante foi obtido por Queiroz et al. (2010) que, ao compararem a imunoexpressão de p27 em mucosa normal com a encontrada em carcinomas epidermóides de boca, obtiveram uma menor expressão estatisticamente significativa nas amostras de carcinomas epidermóides. Essas conclusões corroboram nossos achados, que também mostraram uma perda significativa de expressão em carcinomas epidermóides de boca quando esse grupo foi correlacionado com o grupo controle.

Em relação à expressão de p27 nas leucoplasias com vários graus de displasias, os resultados encontrados na literatura são os mais diversificados. Há estudo que não mostra diferença na expressão da proteína nos vários graus de displasias (Jordan et al., 1998), outro inferi redução significativa somente nas displasias moderadas (Kovesi; Szende, 2006), outro revela redução significativa apenas nas displasias intensas (Shintani et al., 2002), como há estudo que exhibe redução da expressão a medida que ocorre progressão em direção ao carcinoma (Schoelch et al., 1999), e por fim há investigação que não encontrou diferença entre

os diferentes graus de displasias (Jordan et al., 1998). Nosso estudo, ao analisar a expressão de p27 em lesões displásicas, revelou um resultado inesperado. Embora não gerassem resultados estatisticamente significantes, a expressão de p27 aumentou à medida que as lesões progrediram de leve para intensa. Isto pode ser devido a um mecanismo de defesa contra a transformação maligna.

O consenso observado dos resultados obtidos por nosso estudo com os achados relatados na literatura foi, portanto, uma menor expressão de p27 em amostras de carcinomas, quando comparados com o grupo que apresentava a mucosa normal. Do exposto parece lícito hipotetizar que a diminuição da expressão de p27 participa do processo de carcinogênese oral, necessitando de futuras investigações, entretanto, para determinar em que etapa da evolução através das displasias tal alteração molecular ocorre de maneira mais significativa. Futuras investigações são necessárias para determinar o mecanismo por trás da diminuição da expressão de p27 em carcinomas epidermóides de boca, entre as possibilidades sugere-se uma baixa quantidade de RNAm ou o aumento da degradação dependente do sistema ubiquitina-proteossoma.

Proteínas mantenedoras do minicromossomos (MCM - do inglês minichromosome maintenance proteins 2-7) são essenciais para replicação do DNA de células eucarióticas. Todas as seis proteínas são abundantes no ciclo celular, mas diminuem suas expressões rapidamente quando ocorre diferenciação celular e na quiescência, tornando-as proteínas específicas, capazes de marcar células que entram no ciclo celular. Anticorpos contra MCMs detectam mais células em proliferação nos tecidos do que outros marcadores de proliferação, como Ki-67 e antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) (Freeman et al., 1999; Scott et al., 2006). Nós investigamos a expressão da proteína MCM3, um dos componentes do complexo pre-replicativo em lesões displásicas orais, em epitélio normal e em carcinomas epidermóides de boca. Para o melhor de nosso entendimento este estudo é o primeiro a investigar esta proteína nessas condições. Nossos resultados mostraram que a expressão de MCM3 apresentou-se estatisticamente maior quando as amostras de displasias intensas e de carcinomas foram comparadas com as que continham tecido normal e displasias leves.

Como comentado anteriormente, ao avaliar a expressão de Ki-67 entre as displasias epiteliais não observamos diferenças estatisticamente significantes. Por outro lado ao correlacionar às expressões de MCM3 entre os grupos com displasias,

verificou-se que o grupo com displasias intensas exibiu maior expressão quando correlacionado com o grupo com displasia leve. Tal diferença pode ser atribuída ao fato de que a proteína MCM3 além de ser expressa nas células epiteliais em proliferação, possivelmente, mostrou sua marcação nas células que estavam prontas para entrar no ciclo celular. Nessa linha de pensamento o estudo de Endl et al. (2001) mostrou que a proteína MCM3 pode ser expressa em células que não estejam em fase proliferativa, portanto, Ki-67 negativo, e que estejam sofrendo diferenciação celular, p27 ausente. Dependendo do ambiente celular tais células poderiam estar aptas a entrar no ciclo celular ativo.

Dois estudos, ao avaliarem membros da família Mcm, encontraram diferenças entre lesões displásicas orais. Scott et. al. (2006) inferiram que Mcm-2 se mostrou mais expressas nos casos de displasias moderada/intensa e em casos de carcinomas epidermóides de boca quando comparadas aos casos de hiperqueratose e displasias leves e Gouvêa et al. (2010) analisaram a expressão de Mcm-2 e Mcm-5 em amostras de leucoplasia verrucosa com displasia leve, moderada e intensa e em casos de carcinomas. Os autores constataram forte positividade em casos de displasias leves e moderadas e índices de marcação também foram mais significativos em casos de carcinomas. Outra investigação conduzida por Torres-Rendon et al. (2009) mostraram que a expressão de MCM2 foi significativamente maior em lesões displásicas que progrediram para carcinoma do que naquelas displasias que não evoluíram para carcinoma.

Atualmente não foi encontrada uma proteína que isoladamente funcione de maneira efetiva como um marcador da transformação maligna de leucoplasias. Presumivelmente, isto se deve a natureza do desenvolvimento do carcinoma oral, que acontece em diversas etapas, envolvendo uma rede de genes. Nessa linha de pensamento Nasser et al. (2011), Kushner et al. (1997) e Kumar et al. (2012) relataram a relevância da correlação da proteína Ki-67 com p53 para definir as leucoplasias que com maior potencial de transformação maligna. Desse modo estamos de acordo com a asseveração de Nasser et al. (2011), parece necessário pesquisar expressões de múltiplas proteínas simultaneamente em amostras clínicas para encontrar marcadores que possam melhor predizer o risco de transformação maligna das leucoplasias”.

Neste estudo houve uma correlação estatisticamente significante quando as proteínas Ki-67, MCM3 e p27 foram comparadas entre si nas amostras de mucosa

normal e de carcinomas epidermóides. Esses achados suportam o conceito de antagonismo mútuo entre os circuitos celulares que controlam a proliferação e a diferenciação celular. Verificou-se, também, uma correlação significativa entre as proteínas MCM3 e p27 em lesões com displasias moderadas, mostrando-se útil a avaliação em conjunto dessas proteínas nessa condição.

Um resultado, digno de nota, é a expressão estatisticamente significativa entre Ki-67 e MCM3 nas amostras estudadas. A relação entre Ki-67/MCM3 pode estimar a proporção de células que estão licenciadas para proliferar (fase G1 precoce e tardia), portanto, uma alta razão entre Ki-67/MCM3 indica alto padrão de proliferação.

Por fim, ao correlacionar a imunomarcagem das proteínas p27 e MCM3 em todas as amostras estudadas observou-se uma forte correlação, com os resultados tendendo a mostrarem-se estatisticamente significante, condição que não aconteceu com a correlação entre p27 e Ki-67. Esses resultados suportam a ideia de que a proteína MCM3 apresenta-se como um melhor marcador do que o Ki-67 para avaliar em dada população a razão entre proliferação e diferenciação celular.

Em conclusão, MCM3 apresenta-se como um marcador de proliferação superior à proteína Ki-67 em lesões displásicas bucais, uma vez que houve um aumento significativo da expressão de MCM3 em lesões com displasias intensas quando comparado com os casos que apresentavam displasia leve, já Ki-67 não evidenciou aumento estatisticamente significativo entre os diferentes grupos de displasias investigados. Tal inferência se prende ao fato de que MCM3 indica também aquelas células que têm permissão, ou estão prontas, para proliferar.

7 CONCLUSÃO

A expressão da proteína ki-67 quando avaliada isoladamente tem pouco suporte de diagnóstico para diferenciar lesões displásicas. Porém, quando avaliada em conjunto com MCM3 e P27 torna-se importante marcador molecular destas displasias.

É possível também afirmar, que a expressão da proteína MCM3 apresenta-se como melhor marcador de proliferação celular do que a proteína KI67 para avaliar lesões displásicas bucais. Sendo um importante marcador para avaliar em dada população celular a razão entre proliferação e diferenciação celular.

Que a relação entre MCM3 e p27 em displasia moderada e Ki-67 e MCM3 em displasias intensas podem ser úteis para identificar a relação proliferação e diferenciação celular.

Parece ser necessário pesquisar a expressão de múltiplas proteínas simultaneamente em amostras clínicas para encontrar marcadores moleculares que possam melhor prever o risco de transformação das displasias orais em carcinoma epidermoide de boca.

REFERÊNCIAS¹

Abukhdeir A, Park BH. p21 and p27 roles in carcinogenesis and drug resistance. *Expert Rev Mol Med*. 2007;7:1-16.

Ahluwalia KP. Assessing the oral cancer risk of South Asian immigrants in New York City. *Cancer*. 2005;104(12):2959-61.

Alkarain A, Jordan R, Slingerland J. p27 deregulation in breast cancer: prognostic significance and implications for therapy. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004;9(1):67-80.

Angiero F, Berenzi A, Benetti A, et al. Expression of P16, P53 and Ki-67 Proteins in the Progression of Epithelial Dysplasia of the Oral cavity. *Anticancer Res* 2008; 28:2535-40.

Balvinder SS, Jarvis C, Clarke RB, et al. Estrogen Receptor-Positive Proliferating Cells in the Normal and Precancerous Breast. *Am J Pathol*. 1999;155(6):1811-5.

Bell RB, Kademani D, Home L, et al. Tongue cancer: Is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65:229-36.

Berns K, Martins C, Dannenberg JH, et al. p27kip1-independent cell cycle regulation by MYC. *Oncogene*. 2000;19(42):4822-7.

Blow JJ, Ge XQ. Replication forks, chromatin loops and dormant replication origins. *Gen Biol*. 2008;9(12):244-51.

¹ De acordo com estilo Vancouver.

Bochmanet ML, Schwacha A. The Mcm complex: unwinding the mechanism of a replicative helicase. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009;73(4):652-83.

Boehm M, Yoshimoto T, Crook MF, et al. A growth factor-dependent nuclear kinase phosphorylates p27(Kip1) and regulates cell cycle progression. *EMBO J.* 2002;21:3390– 401.

Bonetti A, Zaninelli M, Rodella S, et al. Tumor proliferative activity and response to first-line chemotherapy in advanced breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treatment.* 1996;38(3):289-97.

Bowers JL, Randell JC, Chen S, Bell SP. ATP hydrolysis by ORC catalyzes reiterative Mcm2-7 assembly at a defined origin of replication. *Mol Cell.* 2004 22;16(6):967-78.

Brasil. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa/2012 incidência de câncer no Brasil [30 jun 2013]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estima/2012/>.

Braun N, Papadopoulos T, Müller-Hermelink HK. Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. *Virchows Arch.* 1988;56(1):25-33.

Brown RW, Allred CD, Clark GM, et al. Prognostic value of Ki-67 compared to S-phase fraction in axillary node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1996;2(3):585-92.

Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Proliferation.* 1992;25(1):31-40.

Busby-Earle RM, Steel CM, Williams AR, et al. p53 mutations in cervical carcinogenesis--low frequency and lack of correlation with human papillomavirus status. *Br J Cancer.* 1994;69(4):732-7.

Capila MV, Olid MNR, Gaya MVO, et al. Factors related to survival from oral cancer in an Andalusian population sample (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007 Nov;12(7):518-23.

Chatrath P, Scott IS, Morris LS, et al. Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions. *Br J Cancer*. 2002;89:1048–54.

Chevillard S, Lebeau J, Pauillart P, et al. Biological and clinical significance of current p53 gene alteration, MDR1 gene expression and S. phase fraction analyses in breast cancer patients treated with primary chemotherapy or radiotherapy. *Chin Cancer Rev*. 1997 Dec;3(12pt 1):247-8

Chin D, Boyle GM, Williams RM, et al. Novel markers for poor prognostic in head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2005;113:789-97.

Choi HR, Tucher SA, Huang Z, et al. Differential expression of cyclin dependent kinase inhibitors (p27 and p21) and their relation to p53 and ki-67 in oral squamous tumorigenesis. *Int Oncol*. 2003;22:409-14.

Chu I, Sun J, Arnaout A, et al. p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell*. 2007;128:281-94.

Chuang CH, Yang D, Bai G, et al. Post-transcriptional homeostasis and regulation of MCM2–7 in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2012;40:4914-24.

Cipriano SC, Chen L, Burns KH, et al. Inhibin and p27 interact to regulate gonadal tumorigenesis. *Mol Endoc*. 2001;15(6):985-96.

Colombo J, Rahal P. Alterações genéticas em câncer de cabeça e pescoço. *Rev Bras Cancerol*. 2009;55(2):165-74.

Davies RJ, Freeman A, Morris LS, et al. Analysis of minichromosome maintenance proteins as a novel method for detection of colorectal cancer in stool. *Lancet*. 2002;359:1917-9.

Di Cristofano A, De Acetis M, Koff A, et al. Pten and p27KIP1 cooperate in prostate cancer tumor suppression in the mouse. *Nature Gene*. 2001;27(2):222-34.

Dietrich T, Reichart PA, Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Onco*. 2004;40:158-63.

Dong Y, Sui L, Watanabe Y, et al. Prognostic significance of Jab1 expression in laryngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2005;11(1):259-66.

Dudderidge TJ, Stoeber K, Loddo M, et al. Mcm2, Geminin, and Ki67 define proliferative state and are prognostic markers in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(7):2510-7.

Endl E, Kausch I, Baack M, et al. The expression of Ki-67, MCM3, and p27 defines distinct subsets of proliferating, resting, and differentiated cells. *J Pathol* 2001;195:457- 62.

Fero ML, Rivkin M, Tasch M, et al. A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)- deficient mice. *Cell*. 1996;85:733–44.

Freeman A, Morris LS, Mills AD, et al. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res*. 1999;5:2121-32.

Fujieda S, Inuzuka M, Tanaka N, et al. Expression of p27 is associated with Bax expression and spontaneous apoptosis in oral and oropharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 1999;84(3):315-20.

Gambichler T, Breininger A, Rotterdam S, et al. Expression of minichromosome maintenance proteins in Merkel cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2009;23(10):1184-88.

Gauchotte G, Vigouroux C, Rech F, et al. Expression of minichromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histologic grade and clinical outcome. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(2):283-91.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991;138(4):867-73.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983;31(1):13-20.

Giaginis C, Giagini A, Tsourouflis G, et al.. MCM-2 and MCM-5 expression in gastric adenocarcinoma: clinical significance and comparison with Ki-67 proliferative marker. *Diagn Dis Sci*. 2011;56(3):777-85.

Going JJ, Keith WN, Neilson L, et al. Aberrant expression of minichromosome maintenance proteins 2 and 5, and Ki-67 in dysplastic squamous oesophageal epithelium and Barrett's mucosa. *Gut*. 2002;50:373–77.

Gonzales-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, et al. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: Why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol*. 2010;46:525-30.

Gonzalez MA, Pinder SE, Callagy G, et al. Minichromosome maintenance protein 2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(23):4306-13.

Gouvêa AF, Vargas PA, Coletta RD, et al. Clinicopathological features and immunohistochemical expression of p53, Ki-67, Mcm-2 and Mcm-5 in proliferative verrucous leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2010;39:447–52.

Gozuacik D, Chami M, Lagorce D, et al. Identification and functional characterization of a new member of the human Mcm protein family: hMcm8. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(2):570-9.

Grimmler M, Wang Y, Mund T, et al. Cdk-inhibitory activity and stability of p27Kip1 are directly regulated by oncogenic tyrosine kinases. *Cell*. 2007;128(2):269-80.

Grogan TM, Lippman SM, Spier CM, et al. Independent prognostic significance of a nuclear proliferation antigen in diffuse large cell lymphomas as determined by the monoclonal antibody Ki-67. *Blood*. 1988;71:1157-60.

Guida T, Salvatore G, Faviana P, et al. Mitogenic effects of the up-regulation of minichromosome maintenance proteins in anaplastic thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metabol*. 2005;90(8):4703- 9.

Gümüş ZH, Du B, Kacker A, et al. Effects of tobacco smoke on gene expression and cellular pathways in a cellular model of oral leukoplakia. *Cancer Prev Res*. 2008;1:100-11.

Ha SA, Shin SM, Namkoong H, et al. Cancer-associated expression of minichromosome maintenance 3 gene in several human cancers and its involvement in tumorigenesis. *Clin Cancer Res*. 2004;15;10(24):8386-95.

Hafian H, Venteo L, Sukhanova A, et al. Immunohistochemical Study of DNA topoisomerase I, DNA topoisomerase II α , p53, and Ki-67 in oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinomas. *Human Pathol*. 2004;35:745-51.

Helfenstein A, Frahm SO, Krams M, et al. Minichromosome maintenance protein (MCM6) in low-grade chondrosarcoma: distinction from enchondroma and identification of progressive tumors. *Am J Clin Pathol*. 2004;122(6):912-8.

Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*. 1996;271:1861–4.

Ide, R, Misque, T, Fujino, Y, et al. Cigarette Smoking, alcohol drinking, and oral and farynge câncer mortality in Japan. *Oral Dis*. 2008;14:314-9.

Isola J, Helin H, Kallioniemi OP. Immunoelectron-microscopic localization of a proliferation-associated antigen Ki-67 in MCF-7 cells. *Histochem J*. 1990;22(9):498-506.

Ito Y, Matsuura N, Sakon M, et al. Expression and prognostic roles of the G1-S modulators in hepatocellular carcinoma: p27 independently predicts the recurrence. *Hepatology*. 1999;30:90–9.

Jordan RCK, Grace Bradley G, Slingerland J. Reduced levels of the cell-cycle Inhibitor p27Kip1 in epithelial dysplasia and carcinoma of the oral cavity. *Am J Pathol*. 1998;152:585-90.

Kearsey SE, Labib K. MCM proteins: evolution, properties, and role DNA replication. *Biochim Biophysys Acta*. 1998;1398(2):113-36.

Kikuchi J, Kinoshita I, Shimizu Y, et al. Minichromosome maintenance (MCM) protein 4 as a marker for proliferation and its clinical and clinicopathological significance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011;72(2):229-37.

Kiyokawa H, Kineman RD, Manova TKO, et al. Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell*. 1996;85(5):721-32.

Kodani I, Osaki M, Shomori K, et al. Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2003;32(8):468-74.

Kovesi G, Szende B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2006;35:274-7.

Kudo Y, Takata T, Ogawa I, et al. Reduced expression of p27Kip1 correlates with an early stage of cancer invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Letter.* 2000;151:217-22.

Kudo Y, Takata T, Yasui W, et al. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. *Cancer.* 1998;83(12):2447-55.

Kumar P, Kane S, Rathod GP. Coexpression of p53 and Ki-67 and lack of c-erbB2 expression in oral leukoplakias in India. *Braz Oral Res.* 2012;26:228-34.

Kuo MY, Hsu HY, Kok SH, et al. Prognostic role of p27Kip1 expression in oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol.* 2002;38:172-8.

Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2003;32:513-21.

Kushner J, Bradley G, Jordan RCK. Patterns of p53 and Ki-67 protein expression in epithelial dysplasia from the floor of the mouth. *J Pathol.* 1997;183:418-23.

Li SS, Xue WC, Khoo US, et al. Replicative MCM7 protein as a proliferation marker in endometrial carcinoma: a tissue microarray and clinicopathological analysis. *Histopathol.* 2005;46(3):307-13.

Liku ME, Nguyen VQ, Rosales AW, et al. CDK phosphorylation of a novel NLS-NES module distributed between two subunits of the Mcm2-7 complex prevents chromosomal rereplication. *Mol Biol Cell.* 2005;16(10):5026-39.

Lima GR, Facina G, Shida JY, et al. Effects of low dose tamoxifen on normal breast tissue from premenopausal women. *Eur J Cancer.* 2003;39:891-8.

Liu H, Takeuchi S, Moroi Y, et al. Expression of minichromosome maintenance 5 protein in proliferative and malignant skin diseases. *Int J Dermatol*. 2007; 46(11):1171-76.

Liu M, Li JS, Tian DP, et al. MCM2 expression levels predict diagnosis and prognosis in gastric cardiac cancer. *Histol Histopathol*. 2013;28(4):481-92.

Liu SH, Szanto, AJPK. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol*. 2000;36:145-51.

Liu YZ, Jiang YY, Hao JJ, et al. Prognostic significance of MCM7 expression in the bronchial brushings of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*. 2012;77(1):176-82.

Lloyd RV, Jin L, Qian X, et al. Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol*. 1997;150:401-7.

MacGrogan G, Jollet I, Huet S, et al. Comparison of quantitative and semiquantitative methods of assessing MIB-1 with the S-phase fraction in breast carcinoma. *Modern Pathol*. 1997;10(8):769-76.

Maiorano D, Lutzmann M, Méchali M. MCM proteins and DNA replication. *Curr Opinion Cell Biol*. 2006;18(2):130- 6.

Meng MV, Grossfeld GD, Williams GH, et al. Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(9):2712-8.

Mineta H, Miura K, Suzuki I, et al. Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1999;85:1011-7

Moral M, Paramino J M. Akt Pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. *Histol Histopathol*. 2008;23(10):1269-78.

Moreno-Lopez LA, Gomez GCE, Navarro AG, et al. Risk of oral câncer associated smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case control study in Madrid-Spain. *Oral Oncol*. 2000;36:170-4.

Morse DE, Psoter WJ, Cleveland D, et al. Smokiing and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. *Cancer Causes Control*. 2007;18:919-29.

Muwonge R, Ramadas K, Sankila R, et al. Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drink in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: A nested case-control design using incident cancer cases. *Oral Oncol*. 2007;44(5):446-54.

Nakayama K, Ishida N, Shirane M, et al. Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*. 1996;85(5):707-20.

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.

Nasser W, Flechtenmacher C, Holzinger D, et al. Aberrant expresion of p53, p16^{INK4a} and Ki-67 as basic biomaker for malignant progression of oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2011;40:629-35.

Neville B.W, Damm D.D, Allen C.M, et al. *Patologia oral e maxillofacial*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 798p.

Nickeleit I, Zender S, Kossatz U, et al. p27kip1: a target for tumor therapies?. *Cell Div*. 2007;9:2:13.

Nodin B, Fridberg M, Jonsson L, et al. High MCM3 expression is an independent biomarker of poor prognosis and correlates with reduced RBM3 expression in a prospective cohort of malignant melanoma. *Diagn Pathol*. 2012;30(7):115-26.

Ogden GR. Acohol. *Oral Cancer*. 2005;35:169-73.

Park YJ, Kwak SH, Kim DC, et al. Diagnostic value of galectin, HBME-1, cytokeratin 19, high molecular weight cytokeratin, cyclin D1 and p27 (kip1) in the differential diagnosis of thyroid nodules. *J Korean Med Sci*. 2007;22(4):621-8.

Parise O, Jr. *Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos*. 1ªed. São Paulo: Sarvier; 2000.

Padmanabhan V, Callas P, Philips G, et al. DNA replication regulation protein Mcm7 as a marker of proliferation in prostate cancer. *J Clin Pathol*. 2004;57(10):1057-62.

Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, et al. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proceeding Acad Sci.* 2006;103:15558–63.

Pietenpol JA, Bohlander SK, Sato Y, et al. Assignment of human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res.* 1995;55:1206–10.

Pinder SE, Wencyk P, Sibbering DM, et al. Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. *Br J Cancer.* 1995;71(1):146-9.

Pitiyage G, Tilakaratne WM, Tavassoli M, et al. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol,* 2008;38:737-75.

Philipp SJ, Payne SR, Kemp CJ. p27Kip1: Regulation and function of a haploinsufficient tumor suppressor and its misregulation in cancer. *Exp Cell Res.* 2001;264:148- 68.

Pontes FSC, Fonseca FP, Silva TSP, et al. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth: analysis of survival rate and independent prognostic factors in the Amazon region. *J Craniofacial Surg.* 2011;22:925-30.

Pontes HAR, Pontes FSC, Fonseca FP, et al. Nuclear factor κ B and cyclooxygenase-2 immunoexpression in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol.* 2013;17:45-50.

Pontes HAR, Xavier FCA, Silva TSP, et al.. Metallothionein and p-Akt proteins in oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(8):644-50.

Queiroz AB, Fococchi G, Dobo C, Gomes TS, Ribeiro DA, Oshima CTF. Expression of p27, p21WAF/Cip1, and p16INK4a in Normal Oral Epithelium, Oral Squamous Papilloma, and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.* 2010;30: 2799-804.

Queiroz ABP, Focchi GRA, Gomes TS, et al. Estudo de p27, p21, p16 em epitélio escamoso normal, papiloma escamoso e carcinoma de células escamosas da cavidade oral. *J Bras Patol Med Labor.* 2009;45(6):481-8.

Querzoli P, Albonico G, Ferretti S, et al.. MIB-1 proliferative activity in invasive breast cancer measured by image analysis. *J Clin Pathol*. 1996;49(11):926-30.

Railo M, Lundin J, Haglund C, et al. Ki-67, p53, Er-receptors, ploidy and S-phase as prognostic factors in T1 node negative breast cancer. *Acta Oncol*. 1997;36(4):369-74.

Raju B, Mehrotra R, Oijordsbakken G, et al. Expression of p53, Cyclin D1 and Ki-67 in pré-malignant and malignant oral lesions: association with clinicopathological parameters. *Anticancer Res*. 2005;25:4699-706.

Ramnath N, Hernandez FJ, Tan DF, et al. MCM2 is an independent predictor of survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(22):4259-66.

Rattner JB, Wang T, Mack G, et al. 410. MSA-36: a chromosomal and mitotic spindle-associated protein. *Chromosoma*. 1992;101(10):625-33.

Regesi, JÁ, Ciuuba JJ, Jordan RCK. *Patologia oral: correlações clinicopatológicas*. 5ª ed. São Paulo: Elsevier; 2008. 417p.

Ribeiro DC, Netto FOG, Sousa SF, et al. Immunohistochemical expression of EGFR in oral leukoplakia: Association with clinicopathological features and cellular proliferation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17:739-44.

Rose DSC, Maddox PH, Brown DC. Which proliferation markers for routine immunohistology? A comparison of five antibodies. *J Clin Pathol*. 1994;47:1010-4.

Russo AA, Jeffrey PD, Patten AK, et al. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A–Cdk2 complex. *Nature*. 1996;382:325–31.

Saydam O, Senol O, Schaaij-Visser;TB, et al. Comparative protein profiling reveals minichromosome maintenance (MCM) proteins as novel potential tumor markers for meningiomas. *J Proteome Res*. 2010;9(1):485-94.

Scheifele C, Reichart PA. Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia? *Oral Oncol*. 2003;39:470-5.

- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-63: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle maintaining proteins. *J Cell Biol.* 1993;123(3):513-52.
- Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, et al. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1999;35:333-42.
- Scholzen T, Gerdes J. The ki67 protein: from the know and unknow. *J Cell Physiol.* 2000;182:311-32.
- Scott IS, Odell E, Chatrath P, et al. A minimally invasive immunocytochemical approach to early detection of oral squamous cell carcinoma and dysplasia. *Br J Cancer.* 2006;94:1170-5.
- Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic in oral and head and neck squamous cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000;36:256-63.
- Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: Positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Develop.* 1999;13:1501-12.
- Shibata K, Kajiyama H, Ino K, et al. Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. *Ann Oncol.* 2008;19:81-5.
- Shin I, Yakes FM, Rojo F, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27Kip1 at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nature Med.* 2002;8:1145-52.
- Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, et al. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol.* 2002;38:235-43.
- Shusuke T, Blow J. The replication licensing system. *Biol Chem.* 1998;379:941-9.
- Slingerland J, Pagano M. Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol.* 2000;183:10-7.

Smith J, Rattay T, McConkey C, et al. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. *Oral Oncol.* 2009;45:647-53.

Staed BE, Sorbara CD, Bradl CJ, et al. ATP binding and hydrolysis by MCM2 regulate DNA binding by MCM complexes. *J Mol Biol* 2009;391:301-13.

Starborg M, Gell K, Brundell E, et al. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. *J Cell Sci.* 1996;109:143-53.

St Croix B, Florenes VA, Rak JW, et al. Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nature Med.* 1996;2:1204-10.

Stoeber K, Swinn R, Prevost AT, et al. Diagnosis of genito-urinary tract cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments. *J Nat Cancer Inst.* 2002;17;94(14):1071-9.

Szajerka A, Dziegiel P, Szajerka T, et al. Immunohistochemical evaluation of metallothionein, Mcm-2 and Ki-67 antigen expression in tumors of the adrenal cortex. *Anticancer Res.* 2008;28:2959-66.

Szelachowska J, Dziegiel P, Jelen-Krzeszewska J, et al. Mcm-2 protein expression predicts prognosis better than Ki-67 antigen in oral cavity squamocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2006;26:2473-8.

Tabor MP, Braakhuis BJM, van der Wal JE, et al. Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. *J Pathol.* 2003;199:354-60.

Takeda T, Sugihara K, Hirayama Y, et al. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p63 expression in oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2006;35:369-75.

Tamura T, Shomori K, Haruki T, et al. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim Biophys Acta* 1998;1398:113-36.

Todd R, Hinds PW, Munger K, et al. Cell Cycle Dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;3:51-61.

Todd R, Macbride J, Tsuji T, et al. Deleted in oral cancer (doc-1), a novel oral tumor suppressor gene. *Faseb J*. 1995;(13):1362-70.

Tokuyasu N, Shomori K, Nishihara K, et al. Minichromosome maintenance 2 (MCM2) immunoreactivity in stage III human gastric carcinoma: clinicopathological significance. *Gastric Cancer*. 2008;11(1):37-46.

Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT, et al. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2009;100:1128 -34.

Toyokawa G, Masuda K, Daigo Y, et al. Minichromosome maintenance protein 7 is a potential therapeutic target in human cancer and a novel prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. 2011;28(10):65-71.

Tsuyama T, Tada S, Watanabe S, et al. Licensing for DNA replication requires a strict sequential assembly of Cdc6 and Cdt1 onto chromatin in *Xenopus* egg extracts. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(2):765-75.

Van Dierendonck JH, Keijzer R, van de Velde CJ, et al. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1989;49(11):2999-3006.

Van Oijen MG, Medema RH, Slootweg PJ, et al. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. *Am J Clin Pathol*. 1998;110:24-31.

Vered M, Allon I, Dayan D. Maspin, p53, p63, and Ki-67 in epithelial lesions of the tongue: from hyperplasia through dysplasia to carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2009;38:314-20.

Venkatesan TK, Kuropkat C, Caldarelli DD, et al. Prognostic significance of p27 expression in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Laryngoscope*. 1999;109(8):1329-33.

Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, et al. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci*. 1989;92:531-40.

Vielh P, Chevillard S, Mosseri V, et al. Ki67 index and S-phase fraction in human breast carcinomas. Comparison and correlations with prognostic factors. *Am J Clin Pathol.* 1990;94(6):681-6.

Vora HH, Shah NG, Patel DD, et al. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. *J Oncol.* 2003;82:34-50.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36:575-80.

Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cycle cell control. *Cell.* 1995; 81:323-30.

Wintzer HO, Zipfel I, Schulte-Mönting J, et al. Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer.* 1991;15;67(2):421-8.

Williams GH, Romanowski P, Morris L, et al. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. *Proceeding Natl Acad Sci USA.* 1998;95:14932-7.

Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, et al. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001;27(4):305-13.

Who Collaborating Reference Centre for Oral Precancerous. Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg.* 1978;46:517-39.

Wynne CH, Ross G, Sacks N, et al. Effects of the aromatase inhibitor letrozole on normal breast epithelial cell proliferation and metabolic indices in postmenopausal women: A pilot study for breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11:614-21.

Wunsch-Filho, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brasil. *Oral Oncol.* 2002;38:737-46.

Yeole BB, Ramanakumar A.V, Sankaranayanan R. Survival from oral cancer in Mumbai (Bombai), India. *Cancer Causes Cont.* 2003;14:945-52.

Yoshida K. Identification of a novel cell-cycle-induced MCM family protein MCM9. *Biochem Biophys Res Community*. 2005;331:669-74.

Zeng Y, Hirano K, Hirano M, et al. Minimal requirements for the nuclear localization of p27(Kip1), a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Community*. 2000;274:37–42.

Zhou YM, Zhang XF, Cao L, et al. MCM7 expression predicts post-operative prognosis for hepatocellular carcinoma. *Liver Int*. 2012;32(10):1505-9.

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS KI-67, MCM3 E P27 EM LEUCOPLASIAS E CARCINOMA EPIDERMÓIDES DE BOCA.

Pesquisador: Décio dos Santos Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 15731713.9.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 320.549

Data da Relatoria: 02/08/2013

Apresentação do Projeto:

Serão analisadas 20 amostras de leucoplasias bucais, 10 apresentando displasia leve e 10 apresentando displasia intensa, 20 de carcinoma epidermóide de boca e 10 de mucocela emblocadas em parafina provenientes do serviço de patologia bucal do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará e do Serviço de Diagnóstico em Patologia Oral da Universidade de São Paulo. O teste Kruskal Wallis e o teste de Dunns serão usados para determinar a diferença dos grupos entre si. Para avaliar a correlação das proteínas entre si será utilizado o teste de correlação de Pearson. Para análise estatística será utilizado o software BioEstat 5.0. Será um valor $p < 0.05$ para considerar a análise estatisticamente significativa.

Objetivo da Pesquisa:

Como as proteínas Ki-67, P27 e MCM3 têm sido consideradas importantes na avaliação do

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

Continuação do Parecer: 320.549

potencial

maligno de lesões, bem como no prognóstico de neoplasias humanas, este estudo se propõe a avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas Ki-67, p27 e MCM3 em leucoplasias, com diferentes graus de displasias, e em carcinoma epidermóide de boca com o objetivo de sugerir a participação dessas proteínas na aquisição de fenótipo maligno.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores trabalharão com material biológico armazenado em dois acervos e garantem a manutenção do sigilo quanto à identidade dos sujeitos a despeito de utilizarem dados dos prontuários dos mesmos. Após a utilização para pesquisa, o material biológico estudado será devolvido ao acervo de origem. Os benefícios indiretos do estudo justificam a utilização do material.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo prevê a utilização de cortes histológicos provenientes de alguns acervos de material biológico e a utilização desse material será feita de forma a manter o sigilo da identidade dos sujeitos. Não houve a necessidade de TCLE por tratar-se de dados secundários coletados não por ocasião da pesquisa. O cronograma apresentado é condizente com a proposta do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresenta autorização para uso dos arquivos de cortes histológicos da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia da USP e do Hospital João de Barros Barreto da UFPA.

Recomendações:

As pendências anteriores foram atendidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O protocolo apresentado contempla os preceitos éticos desejáveis. Segundo Carta Circular nº. 039/2011/CONEP/CNS/GB/MS, de 30 de setembro de 2011, contudo não cabe ao Sistema CEP/CONEP legislar sobre o acesso e USO DO PRONTUÁRIO médico (entenda-se odontológico também), porém

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

Continuação do Parecer: 320.549

cabe

determinar o cumprimento do sigilo e da confidencialidade, além de exigir que toda pesquisa envolvendo seres humanos trate os mesmos em sua dignidade, respeite-os em sua autonomia e defenda-os em sua vulnerabilidade, conforme Resolução CNS 446/12. O CEP-FOUSP solicita Carta de autorização pelo uso de prontuários do responsável pela Instituição, ressaltando o cumprimento destas normativas.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 29 de Junho de 2013

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br