

ARLINDO TADEU TEIXEIRA ABURAD

**EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS CICLINA D1, C-JUN E DO
RETINOBLASTOMA E PESQUISA DO HPV EM CARCINOMAS
EPIDERMÓIDES BUCAIS**

São Paulo

2006

Arlindo Tadeu Teixeira Aburad

**Expressão das proteínas ciclina D1, c-jun e do retinoblastoma e
pesquisa do HPV em carcinomas epidermóides bucais**

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

Orientadora: Prof. Dr^a. Suzana Cantanhede Orsini
Machado De Sousa

São Paulo

2006

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

Aburad, Arlindo Tadeu Teixeira
Expressão das proteínas ciclina D1, c-jun e do retinoblastoma e pesquisa do HPV em carcinomas epidermóides bucais / Arlindo Tadeu Teixeira Aburad; orientadora Suzana Cantanhede Orsini Machado De Sousa. -- São Paulo, 2006.

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

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

1. Carcinoma epidermóide bucal 2. ciclina D1 3. c-jun 4. proteína do retinoblastoma 5. imunoistoquímica 6. HPV

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 E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail: aburad@usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aburad A. Expressão das proteínas ciclina D1, c-jun e do retinoblastoma e pesquisa do HPV em carcinomas epidermóides bucais [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, ___/___/___

Banca examinadora

1) Prof(a). Dr(a).: _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a).: _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a).: _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a).: _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a).: _____
Titulação: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICO ESTE TRABALHO

A Deus.

À minha alma gêmea, Débora Pinho, pois sem ela, simplesmente, eu não teria conseguido.

Especialmente à minha filha Aline, pois todo colorido que eu busco na vida ela, juntamente com a mãe, trouxe.

Aos meus pais, Carlos e Rosa, pelo amor, carinho e, principalmente, tempo que dedicaram e dedicam a mim.

Aos meus irmãos Quirino, Carlinhos e Adib. Graças a eles pude ter uma infância extremamente feliz e sei verdadeiramente o que é uma amizade.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Edna Toddai, “in memoriam”, que se eternizou passando seus conhecimentos aos alunos da Patologia Bucal, que futuramente repassarão esses mesmos ensinamentos aos seus estudantes. Agradeço também pela ajuda fundamental neste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, pela orientação neste trabalho.

Aos professores Ney Soares de Araújo e Vera Cavalcante de Araújo.

A Ailton Segura, amigo querido e maior expoente intelectual que já conheci.

A Artur Aburad, primo e amigo que desde de criança eu admirava.

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal, Andréa Mantesso; Décio dos Santos Pinto Jr; Fábio D. Nunes; Karen L. Ortega; Marina H.C.G. Magalhães e Marília T. Martins; pelos conhecimentos passados.

Ao professor Moacir Domingos Novelli pelas agradáveis conversas, pelo memorial por ele escrito que permite reflexões sobre a vida acadêmica e pelos recursos tecnológicos indispensáveis fornecidos à confecção desta tese.

Às atenciosas Bia, Gleice, Nair, Graça, Néia, Patrícia e Zilda, pela boa vontade e atenção que sempre tiveram comigo.

Às funcionárias da Comissão de Pós-Graduação da FOU SP: Cátia, Nair e Alessandra.

À Elisa pela amizade e carinho que sempre teve comigo.

Aos amigos Alexandre Borba e Fábio Lima, amigos de graduação, irmãos de vida e companheiros de luta na grande São Paulo.

A Filipe Modolo Siqueira e Sérgio Melo Alves Jr. pela amizade e ajuda.

A todos meus prezados colegas de turma na pós-graduação e valiosos amigos: Adriano Pires, Alexander Salvoni, Alexandre Fraige, Adriana Neves, Aymman Nassif, Cristane Furuse, Elena Riet, Eveline Turatti, Flávia, Helder, Hu, Cury, Camila, Carolina Capuano, Katiucha, Marcelo Zamunaro, Márcia Gorish, Regina Dorta, Renata Tucci, Rogério Castilho, Vanessa Veltrini, Adriana Etges, Fabrício Bitu, Daniela Bueno, Fabrício Passador, Cláudia Cazal, Felipe Salles, Luciana Matizonkas, Nathalie

Rezende, Cristiane Squarize, Juliana, Tatina, Karen, Kivia, Lineu, Marina, Michelly, Vanessa, Yonara, Carlos Barboza, Paulo, Paulo Braz, Patrícia, Rhoner, Thaís. Aos que aqui não estão, o sentimento é o mesmo.

Aos alunos de graduação Livia Lamunier de Abreu Camargo e Marco Aurélio Alves Feitosa Filho, que se tornaram amigos, pela agradável companhia e convivência.

Aos Professores Ricardo Mesquita e Adriana Etges pelos conselhos que sempre me motivaram.

À CAPES pela concessão da minha bolsa e à FAPESP pelo financiamento do projeto 04-06555-5 da disciplina de patologia bucal da FOU SP.

Aburad A. Expressão das proteína ciclina D1, c-jun, retinoblastoma e pesquisa do HPV em carcinoma epidermóide bucal [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

No Brasil, como no mundo, o carcinoma epidermóide bucal está entre os dez tipos mais comum de câncer e acomete mais de 13 mil pessoas por ano. Apesar de ser um sério problema devido a sua morbidade e mortalidade, alguns casos desta doença têm um comportamento biológico menos agressivo. A proteína ciclina D1, depois que forma complexos com as proteínas CDK4 e CDK6, tem como principal função fosforilar a proteína Retinoblastoma. Após sua fosforilação, a proteína libera um fator de transcrição, o E2F, que leva a célula à progressão da fase G1 para fase S do ciclo celular. A proteína c-jun, que faz parte do fator de transcrição AP-1, tem participação ativa no ciclo celular, principalmente durante a transcrição da fase G0 a G1. O gene retinoblastoma é um supressor de tumor. Este gene codifica uma fosfoproteína nuclear, que recebe o mesmo nome. Essa proteína regula o ciclo celular através de múltiplas funções. Também regula outros processos que afetam a proliferação celular, a diferenciação terminal e a apoptose. O HPV é um vírus de DNA que é encontrado em vários tipos de câncer e é o principal agente etiológico do carcinoma de colo uterino. Este trabalho comparou a expressão das proteínas ciclina D1, c-jun e do retinoblastoma em carcinomas epidermóides de baixo e alto grau de malignidade e tentou analisar se o HPV é um fator etiológico desta neoplasia. Apesar das lesões de baixo grau de

malignidade expressarem as proteínas num maior número de células que as lesões de alto grau, só houve diferença estatística, entre os dois grupos estudados, para a proteína do retinoblastoma. Não foi encontrado o DNA do HPV em nenhum dos casos estudados. De acordo com este trabalho e com a literatura, a proteína do retinoblastoma é expressa em um número menor de células em carcinomas epidermóides bucais mais agressivos e o HPV não é um agente etiológico de todos os casos desta doença.

Palavras-chaves: Carcinoma epidermóide bucal – ciclina D1 – c-jun – proteína do retinoblastoma – HPV – imunohistoquímica – PCR.

Aburad A. Expression of cyclin D1, c-jun, retinoblastoma protein and research of HPV in oral squamous cell carcinoma [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

In Brazil, as in the world, the oral squamous cell carcinoma is among the ten more common types of cancer and affects more than 13 thousand of people by year. Even though it is a serious problem due to its morbidity and mortality, some cases of this disease have a less aggressive biological behavior. The cyclin D1 protein after it forms complexes with the CDK4 and CDK6 proteins has as main function phosphorylate the Retinoblastoma protein. After its phosphorylation, the protein releases a transcription factor, the E2F, that leads the cell to the progression from the phase G1 to the phase S of the cell cycle. The c-jun protein, that is part of the transcription factor AP-1, has active participation in the cell cycle, mainly during the transition from the phase G0 to G1. The retinoblastoma gene is a tumour suppressor. This gene codifies a nuclear phosphoprotein that receives the same name. This protein regulates the cell cycle through multiple functions. It also regulates other processes that affect the cell proliferation, the terminal differentiation and apoptosis. The HPV is a DNA virus that is found in many types of cancer and is the main etiological agent of the cervical cancer. This study compared the protein expression of the cyclin D1, c-jun and retinoblastoma in low and high grade squamous cell carcinoma and tried to analyze if the HPV is a etiological factor for this neoplasm. In spite of the low grade of malignancy lesions express the protein in a greater number of cells than in the high grade lesion, there only was statistical difference, among the two studied groups, for the retinoblastoma protein.

It was not found DNA of the HPV in any of the studied cases. According with this study and with the literature the retinoblastoma protein is expressed in a lower number of cells in the more aggressive oral squamous cell carcinomas and the HPV is not the etiological agent in all of the cases of this disease.

Key-words: Oral squamous cell carcinoma – cyclin D1 – c-jun – retinoblastoma protein – HPV – Immunohistochemistry – PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 – Aspectos histológicos do carcinoma epidermóide bucal de alto grau de malignidade.....	63
Figura 5.2 – Aspectos histológicos do carcinoma epidermóide bucal de baixo grau de malignidade.....	63
Figura 5.3 – Expressão da ciclina D1.....	64
Figura 5.4 – Expressão da c-jun.....	64
Figura 5.5 – Expressão da pRb.....	65
Figura 5.6 – Gel de Agarose mostrando a ausência de amplificação para o HPV nos casos de carcinoma epidermóide estudados, exceto para controle positivo.....	65
Figura 5.7 – Gel de Agarose mostrando a amplificação do gene constitutivo D2S119.....	65
Gráfico 5.1 – Número médio de células positivas para cada proteína estudada.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Dados epidemiológicos dos pacientes estudados.....	43
Tabela 4.2 – Número e porcentagem dos pacientes de acordo com o sexo.....	45
Tabela 4.3 – Número e porcentagem dos pacientes de acordo com a cor da pele.....	45
Tabela 4.4 – Número e porcentagem dos pacientes de acordo com a localização anatômica das lesões.....	45
Tabela 4.5 – Sistema de gradação histológica.....	47
Tabela 5.1 – Lesões de baixo grau de malignidade. Número e percentual de células marcadas e grau histológico de malignidade (GHM).....	60
Tabela 5.2 – Lesões de alto grau de malignidade. Número e percentual de células marcadas e grau histológico de malignidade (GHM).....	61
Tabela 5.3 – Mostrando o número médio de células marcadas para cada proteína estudada dividido pelos grupos analisados.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Ativador da proteína 1
BSA	Sigla em inglês para albumina de soro bovino
C-	Controle negativo
C+	Controle positivo
CDK	Sigla em Inglês para quinases dependentes de ciclina
CD1	Proteína ciclina D1
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Sigla em inglês para ácido desoxirribonucléico
dNTP	Solução de 2'-desorribonucleotídeo 5'-trifosfatado: dATP, dTTP, dCTP e dGTP
E	Sigla em Inglês para early
EDTA	Etileno-diaminotetracético
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HCL	Ácido clorídrico
HPV	Papiloma Vírus Humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KCl	Ácido clorídrico
L	Sigla em Inglês para late
LM	Marcador de pares de base (Low Mass)
Lido	Laboratório de Informática Dedicado a Odontologia

MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
pb	Pares de bases
PCR	Sigla em Inglês para reação em cadeia da polimerase
PRb	Proteína do retinoblastoma
Rpm	Rotação por minuto
SDS	Sigla em Inglês para dodecil sulfato de sódio
TAE	Solução de Tris, ácido acético glacial e EDTA
TBST	Solução salina tamponada TRIS-HCl acrescida de tween
Tris	Tris-hidroxi-metil-aminometano
Tri-HCl	Tris-hidroxi-metil-aminometano/Ácido clorídrico
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra violeta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Valores percentuais
°C	Graus Celsius
g	Gravidade
G0	“Gap”/ intervalo de latência celular
G1	“Gap”/ Intervalo após a mitose e antes da síntese celular
μl	Microlitro
ml	Mililitro
mM	Milimolar
pH	Medida do potencial hidrogeniônico
M	Medida de molaridade
x	vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 Carcinoma epidermóide bucal.....	22
2.2 Ciclina D1.....	23
2.3 c-Jun.....	28
2.4 Retinoblastoma.....	32
2.5 HPV.....	35
3 PROPOSIÇÃO	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Seleção dos casos e análise morfológica.....	42
4.1.1 Dados epidemiológicos dos pacientes estudados.....	43
4.2 Gradação histológica de malignidade.....	46
4.3 Técnica de imunoistoquímica.....	47
4.3.1 Imunoistoquímica da proteína ciclina D1.....	48
4.3.2 Imunoistoquímica da proteína c-jun.....	49
4.3.3 Imunoistoquímica da proteína do retinoblastoma.....	50
4.4 Detecção de DNA de HPV por PCR.....	50
4.4.1 Preparo dos cortes para os casos emblocados em parafina e digestão enzimática	50
4.4.2 Extração do DNA.....	52

4.4.3 PCR.....	52
4.5 Análise quantitativa da expressão das proteínas ciclina D1, c-jun e proteína do retinoblastoma.....	54
4.6 Análise estatística.....	55
5 RESULTADOS.....	56
5.1 Aspectos histológicos do carcinoma epidermóide bucal.....	56
5.2 Expressão imunoistoquímica da ciclina D1.....	56
5.3 Expressão imunoistoquímica da c-jun.....	57
5.4 Expressão imunoistoquímica da pRb.....	58
5.5 Análise de variância.....	59
5.6 Amplificação para o HPV.....	59
6 DISCUSSÃO.....	66
7 CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS.....	78
ANEXO A.....	88

1 INTRODUÇÃO

O câncer atualmente é a segunda causa de morte mais comum no Brasil e no mundo. As doenças cardiovasculares, que matam cerca de 17,5 milhões de pessoas no mundo por ano, ficam em primeiro lugar. O Instituto Nacional do Câncer (BRASIL 2006) estima que, neste ano, ocorram 467.440 novos casos de câncer no Brasil. Do total, 13.470 serão especificamente de boca: 10.060 em homens e 3.410 em mulheres. Aproximadamente 90% dos casos devem ser de carcinoma epidermóide.

O carcinoma epidermóide é o câncer de boca mais comum. Além dos fatores etiológicos reconhecidos e amplamente estudados, como o fumo e o álcool, acredita-se que outros agentes possam ajudar no desenvolvimento dessa doença. Afinal, muitas pessoas que fumam e ingerem bebida alcoólica com frequência não desenvolvem esse câncer. Há estudos que comparam a presença dos fatores etiológicos com a imunexpressão de algumas proteínas sintetizadas durante o ciclo celular. As proteínas ciclina D1 (cD1), c-jun e a proteína do retinoblastoma (pRb) são expressas quando a célula está em divisão. Essas proteínas têm a expressão alterada quando há transformação maligna. Alterações na expressão dessas proteínas podem indicar que o tumor está em estágio avançado e suscitar um pior prognóstico.

No início da década de 80, pesquisadores começaram a investigar se o Papiloma Vírus Humano (HPV), a exemplo do que ocorre nos carcinomas cervicais e anogenitais, desempenharia algum papel no aparecimento do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (SYRJANEN et al., 1983). Porém, apesar dos avanços tecnológicos nas últimas décadas, principalmente nas técnicas de biologia

molecular, ainda não está comprovado que o HPV é um fator etiológico do câncer de boca.

Neste trabalho, pesquisou-se a expressão das proteínas cD1, c-jun e pRb. Também foi investigada a presença do HPV em carcinoma epidermóide bucal pela técnica de PCR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermóide bucal

O câncer de boca gera um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Ele é, juntamente com o carcinoma de laringe, a sexta neoplasia maligna mais freqüente nos seres humanos. Representa 4% de todos os tipos de câncer e 2% das mortes por essa doença (ARAÚJO-FILHO et al., 1998; PARKIN; PISANI; FERLAY, 1993; PARKIN et al., 1993). Os hábitos de fumar, de mascar betel e de consumir excessivamente bebidas alcoólicas destiladas são os principais agentes etiológicos dessa patologia (CASIGLIA; WOO, 2001). Em países em desenvolvimento, como a Índia e o Sri Lanka, onde é hábito mascar betel, o carcinoma epidermóide de boca é o tipo mais comum de câncer e significa mais de 40% de todas as neoplasias malignas (JOHNSON, 1991). No entanto, na França, na Europa central e no Japão também há altas taxas de incidência (FRANCESCHI et al., 2000; JOHNSON, 1991).

Há dados que sugerem que outros fatores têm importante participação no aparecimento da neoplasia, já que apenas um grupo de pessoas com esses vícios a desenvolvem (MILLER et al., 2001). Por outro lado, está comprovado que 80% das pessoas que têm o carcinoma epidermóide bucal fumam e/ou ingerem bebidas alcoólicas destiladas habitualmente.

Estima-se que, no mundo inteiro, mais de 400.000 casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço ocorram anualmente (FERLAY; PIZZANI;

PARKIN, 2001). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, o câncer de boca é a oitava neoplasia mais comum em homens e a nona em mulheres (BRASIL, 2006). Entre as neoplasias malignas de boca, o carcinoma epidermóide representa mais de 90% das lesões malignas que se desenvolvem nessa região (ARAÚJO-FILHO et al., 1998). O carcinoma epidermóide pode ocorrer em qualquer parte da boca. Mas há maior freqüência na língua e no assoalho bucal. Essas regiões são grandes facilitadoras da disseminação dos carcinomas em linfonodos regionais e órgãos distantes (MILLON; CASSISI; MANCUSO, 1994).

A transformação maligna da célula ocorre em várias etapas, numa seqüência de acontecimentos genéticos importantes. Acumulam-se aproximadamente na célula de seis a oito mutações. Essas alterações genéticas se dão em oncogenes dominantes ou em genes supressores de tumor. As transformações em genes, que mantêm a estabilidade genética celular, colaboram para a alteração maligna da célula (HANAHAN; WEINBERG, 2000; LOEB, 2001).

O diagnóstico do câncer bucal deve ser precoce, pois sua evolução natural é rápida. Em um estágio avançado, o paciente pode ficar com seqüela estética ou funcional no aparelho estomatognático ou até morrer (KOWALSKI; CARVALHO, 2001). A radioterapia, a quimioterapia e a reconstrução cirúrgica tiveram significantes avanços nas últimas décadas, mas o prognóstico não se alterou e a sobrevida dos pacientes é de, no máximo, cinco anos em aproximadamente 50% dos casos (HOFFMANN et al., 2005) – porcentagem ainda pequena, principalmente se comparada a outros tipos de neoplasia, como os carcinomas de mama, cólon, reto, rim e melanomas (TODD; DONOFF; WONG, 1997).

2.2 Ciclina D1

As ciclinas são proteínas do ciclo celular das células eucarióticas. Sabe-se que essas proteínas têm grande participação no desenvolvimento de várias neoplasias humanas (MOTOKURA; ARNOLD, 1993; MURRAY; KIRCHNER, 1989). Essas proteínas são chamadas de ciclinas por apresentar concentrações variadas durante o ciclo celular. São conhecidos oito tipos de ciclinas humanas: A, B, C, D, E, F, G e H. A ciclina D tem três subtipos – D1, D2 e D3 –, possui uma meia-vida de aproximadamente 38 minutos e é extremamente instável (GOODER et al., 1997). A ciclina D1 forma complexos com a CDK4 e a CDK6. A função principal desses complexos é fosforilar a proteína retinoblastoma. Após sua fosforilação, a proteína libera um fator de transcrição, o E2F, que leva a célula à progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (CHEN et al., 1999; GOODER et al., 1997). Estudos experimentais demonstram que a ciclina D1 pode funcionar como oncogene, cooperando com outros genes na transformação celular (KUO et al., 1999).

Na tentativa de classificá-la como um marcador biológico indicador de prognóstico, a ciclina D1 já foi objeto de estudo em carcinomas de vários sítios corporais. Sua presença está associada a um pior prognóstico, pois os tumores que a sintetizam em excesso são mais agressivos e invasivos (MASUDA et al., 1996; MATE et al., 1996; SHIN et al., 1997).

Bianchi et al. (1993) notaram, em modelos experimentais realizados em ratos, que a ciclina D1 estava superexpressa em carcinoma epidermóide de pele. Eles perceberam que, em estágios pré-malignos, os níveis de ciclina D1 eram normais. Porém, em estágios avançados, a ciclina D1 exibia superexpressão. Os autores

sugeriram que a alteração na expressão da ciclina D1 poderia ter um papel crítico no desenvolvimento de carcinomas epidermóides de pele de rato.

A ciclina D1, muitas vezes, é superexpressa em casos de carcinoma de grandes células de pulmão. Mate et al. (1996) estudaram sua ocorrência em 56 casos dessas lesões e observaram que 24 (42,8%) apresentavam expressão aumentada. Eles compararam a expressão da ciclina D1 com o Ki-67 para observar a taxa de proliferação celular. Os autores notaram que a taxa de proliferação celular estava associada à expressão da ciclina D1. Outro aspecto do trabalho é que a expressão da ciclina D1 foi totalmente ausente nas áreas de formação de pérolas córneas celular, enquanto nas áreas indiferenciadas essa proteína ficou mais expressa.

Em carcinomas de cabeça e pescoço, a superexpressão da ciclina D1 pode indicar um pobre prognóstico. Michalides et al. (1995) constataram que nessas lesões o prognóstico é mais pobre em tumores com superexpressão dessa proteína. Os autores avaliaram 47 casos e encontraram superexpressão em 30. Nesses casos com superexpressão, eles observaram que o número de recorrência foi maior em um intervalo menor de tempo. Também notaram que 47% não apresentaram recorrência em cinco anos, enquanto nos casos negativos essa taxa foi de 80%. A sobrevida de cinco anos foi de 60% nos casos de superexpressão e de 83% nos casos negativos.

Akerval et al. (1997) também estudaram a expressão da ciclina D1 em casos de carcinomas de cabeça e pescoço. Os autores encontraram superexpressão em menos de 50% dos casos estudados. Porém, eles também conseguiram associar a superexpressão dessa proteína a um pior prognóstico. Eles observaram que,

especificamente nesse trabalho, a superexpressão não está relacionada com o tamanho nem com metástases em linfonodos regionais.

Masuda et al. (1996) analisaram a superexpressão da ciclina D1 em carcinomas epidermóides primários de laringe. Essas lesões estão associadas, geralmente, a um pobre prognóstico. No total, de 42 casos dessas neoplasias eles observaram que 23 (54,8%) exibiam mais de 20% das células marcadas, o que consideraram superexpressão. Eles conseguiram verificar que a superexpressão da ciclina D1 estava relacionada a casos que apresentavam metástases em linfonodos cervicais. Os autores também notaram melhor prognóstico nos casos em que essa proteína foi negativa ou em que a expressão foi inferior a 20% e o paciente submetido a mais de um tratamento.

A análise imunoistoquímica mostra que, em alguns estudos, essa proteína pode ser positiva na maioria dos casos de carcinoma epidermóide de boca. Também sua imunopositividade é mais intensa em lesões classificadas de alto grau de malignidade (NEVES, 2000). Vários outros estudos mencionam a superexpressão da ciclina D1 como um marcador de prognóstico desfavorável em pacientes com carcinoma epidermóide de boca (AKERVALL et al., 1997; MICHALIDES et al., 1997; MINETA et al., 2000). A superexpressão da ciclina D1 nessas lesões também é relacionada a baixa taxa de sobrevida e a presença de metástases em linfonodos cervicais (MINETA et al., 2000; RODOLICO et al., 2005). Isso indica que a expressão da ciclina D1 pode ser um útil marcador biológico na determinação do prognóstico dessa neoplasia.

Miyamoto et al. (2003) avaliaram, juntamente com a superexpressão da ciclina D1, a amplificação do gene dessa proteína. Em 41 casos de carcinoma epidermóide de boca, 13 (31,7%) exibiram amplificação do gene e 27 (65,9%)

superexpressão da proteína. Os autores comprovaram, estatisticamente, que a amplificação do gene da ciclina D1 foi um indicador de prognóstico mais eficiente do que a superexpressão dessa proteína. Ficaram livres da doença três (23,1%) dos 13 casos com amplificação de gene e 18 (64,3%) dos 28 casos que não amplificou. Esse índice de pacientes livres da doença foi maior nos que mostraram superexpressão da proteína – 10 (37,05%) dos 27 com superexpressão e 11 (78,6%) dos 14 que não exibiram superexpressão.

Entretanto, Koontongkaew et al. (2000) notaram que 21 (39,62%) casos de um total de 53 apresentaram superexpressão da ciclina D1. Nesse trabalho, os autores avaliaram a superexpressão das proteínas p53, pRb, ciclina D1 e CDK4. Essa avaliação foi feita de acordo com o percentual de núcleos marcados para cada proteína. Os autores não encontraram nenhuma associação significativa entre as proteínas estudadas, o que indica que a alteração de apenas uma importante proteína reguladora do ciclo celular é suficiente para favorecer a carcinogênese. Eles acreditam que a expressão inapropriada de alguma dessas proteínas contribui para o desenvolvimento do câncer de boca.

Rodolico et al. (2005) estudaram, em carcinoma epidermóide de lábio inferior, a relação entre a ciclina D1 e a presença de metástase em linfonodos. Eles analisaram 97 pacientes que sobreviveram mais de cinco anos. Nesse trabalho, os autores avaliaram cinco parâmetros clínicos e histológicos, como: idade do paciente, tamanho do tumor, gradação histológica, espessura máxima e invasão perineural. Os pesquisadores relacionaram esses dados com a expressão imunoistoquímica da ciclina D1 e da proteína p27 e notaram que uma baixa expressão da p27 associada a tumores maiores e à alta expressão da ciclina D1 favorece a metástase em linfonodos. Esses dados foram diretamente proporcionais à ocorrência de metástase

em menor tempo. Assim, esses autores sugeriram que a imunistoquímica da ciclina D1 pode ser usada rotineiramente para classificar os pacientes que devem receber um tratamento mais agressivo e também pode ajudar a identificar tumores com maior potencial de metástase.

Neves (2000), constatou que a ciclina D1 foi positiva em 24 dos 28 casos analisados de carcinoma epidermóide de boca, o que representa 85,71% de ocorrência dessa doença. Porém, foi considerado positivo o fato de os tumores apresentarem 1% ou mais de células marcadas para a ciclina D1. Talvez por isso o percentual tenha sido pouco maior do que a literatura geralmente descreve. A autora comparou ainda o grau histológico de malignidade com seus resultados e, apesar de não observar diferença estatisticamente significativa, ela encontrou uma marcação média de 19,3% de células nos carcinomas de baixo grau de malignidade ante 26,03% nos de alto grau de malignidade.

2.3 c-Jun

O gene c-jun faz parte da família dos genes JUN. Esses protooncogenes são de resposta primária, induzidos por estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, hormônios e outros mitógenos que, quando expressos, codificam para proteínas nucleares com atividade de fatores de transcrição (RYSECK et al., 1988). A família JUN também é formada pelos genes junB e junD. Tais genes, juntamente com a família dos genes FOS – c-fos, fra1, fra2 e fra3 – codificam fosfoproteínas

nucleares, que se associam e formam o fator de transcrição AP-1 (ativador da proteína 1).

As respectivas proteínas da família FOS e JUN possuem domínio do tipo zíper de leucina (dímero formado por duas α -hélices unidas por interações de leucinas, que são interações hidrofóbicas), domínios de ligação ao DNA, domínios de transativação e domínios de ligação a proteínas do complexo de transcrição basal. Uma vez que fatores de transcrição possuem domínios de zíper de leucina, essas proteínas formam homo e heterodímeros jun-jun ou heterodímeros fos-jun onde qualquer proteína das respectivas famílias pode estar envolvida. O complexo AP-1 regula a transcrição de genes alvos, positivamente ou negativamente, dependendo da composição dos heterodímeros (ANGEL; KARIN, 1991; SASSONE-CORSI et al., 1988).

O fator de transcrição AP-1 é capaz de reconhecer e ligar-se a elementos da região promotora de muitos genes, promovendo sua transcrição (Chiu et al., 1988). Entre esses elementos estão as seqüências FAP (fos-ap1 binding site) ou TER (TPA responsive element, no qual o TPA é o agente mitogênico 12-O-tetradecanoylphorbol – sítio de ligação do fator de transcrição ao DNA do gene – ativador de PKC – via de transdução de sinal), encontradas nos promotores dos genes das famílias FOS, JUN e outros (CURRAN; FRANZA Jr, 1988).

A proteína c-jun tem participação ativa no ciclo celular, principalmente durante a transcrição da fase G0 para a G1. A inibição da expressão dessas proteínas impede a proliferação celular (CURRAN; FRANZA JR, 1988; KOVARY; BRAVO, 1991). E os genes da família JUN podem atuar ainda regulando negativamente os processos de diferenciação celular. Em níveis elevados, a proteína c-jun, juntamente com a

proteína c-fos, inibiu a diferenciação, em cultura celular, de células de osteossarcoma e pré-adipócitos em adipócitos (ANGEL; KARIN, 1991).

Volm et al. (1993) analisaram a expressão imunohistoquímica de algumas proteínas, entre elas a c-jun, e a relacionaram com o prognóstico de 121 pacientes com carcinoma de pulmão. Os autores constataram que os pacientes que exibiram a superexpressão da proteína c-jun tiveram uma sobrevida significativamente menor que aqueles que não apresentaram superexpressão dessa proteína. Nesse trabalho, as análises univariada (Kaplan-Meier-estimates) e multivariada (Cox-regression-model) revelaram que a expressão da proteína c-jun é um importante fator prognóstico dessa doença. Esses autores constataram, em outro trabalho – no qual foram estudados 217 pacientes com câncer de pulmão de células não pequenas –, que tumores com superexpressão da proteína c-jun apresentaram um número significativamente maior de metástase.

Meggiato et al. (2003) estudaram a expressão da proteína c-jun em 23 casos de câncer de pâncreas. Os autores queriam relacionar a proliferação celular e a apoptose com a imunexpressão da proteína c-jun. Essas lesões não tinham recebido nenhum tipo de tratamento. A expressão foi encontrada em 20 (87%) dos 23 casos analisados. Os autores constataram que a expressão dessa proteína não tinha relação com a apoptose. No entanto, as lesões que apresentaram altas taxas de proliferação celular exibiram forte marcação dessa proteína. Ferrara et al. (1999) verificaram a expressão da c-jun e do Ki-67 na mesma lesão. Eles trabalharam com 14 casos de câncer de pâncreas primário, oito metástases de fígado, cinco casos de pancreatites crônicas e cinco casos de tecido de pâncreas normal de pacientes doadores. Apesar desses autores encontrarem positividade para a c-jun em 11 dos 14 casos de carcinomas pancreáticos, a marcação foi mais intensa nos casos de

metástase. Ainda nos casos de sobrevida curta, a marcação foi mais forte se comparada com os casos de maior sobrevida. Os autores acreditam que, nessas lesões, a proteína c-jun pode ser um bom indicador de prognóstico.

Yokoyama et al. (1998) avaliaram a expressão da proteína c-jun em carcinomas endometriais. Em 63 pacientes, eles relacionaram a expressão da proteína com o prognóstico e com a presença de metástases. Foram considerados positivos apenas os casos que exibiram mais de 30% das células com os núcleos marcados; desses, 44% das lesões foram positivas para a c-jun. Os pacientes com superexpressão dessa proteína tiveram pior prognóstico se comparados com aqueles cujas lesões não exibiram a marcação. Os autores ainda observaram que os casos de superexpressão exibiram invasão profunda do miométrio e metástase em linfonodos de região retroperitoneal. Assim, os autores concluíram que os casos com superexpressão da proteína c-jun possuem maior capacidade de metástase.

Sousa et al. (2002) estudaram a proteína c-jun, comparando sua expressão imunohistoquímica, em 20 casos de carcinomas epidermóides de boca e em 15 de tecido normal de mucosa bucal. Os autores constataram que a c-jun está expressa tanto no câncer como no tecido normal. Porém, a diferença é que, nas mucosas, essa proteína é expressa no citoplasma das células das camadas superiores e, nos carcinomas, sua expressão é nuclear. Os autores consideraram essa diferença como um importante indicativo de participação dessa proteína nos casos de carcinoma epidermóide bucal.

Turatti et al. (2005) avaliaram a expressão da proteína c-jun, da c-fos e da ciclina D1 em 15 casos de mucosa bucal normal, em 18 de displasia discreta, em 23 de moderada a intensa e em 24 de carcinoma epidermóide de boca. Em todos os casos estava localizada na língua e os autores consideraram positivas apenas as

marcações nucleares. Nesse trabalho, não foi observada marcação nuclear da proteína c-jun nos casos de mucosa normal e, dos 18 casos de displasia discreta, oito (44,4%) foram positivos. Dos 23 casos de displasia moderada a intensa, 16 (69,5%) foram positivos. Dos 24 casos de carcinoma, 21 (87,5%) apresentaram imunopositividade à proteína c-jun. Os autores acreditam que esses resultados possam demonstrar que a marcação nuclear da c-jun representa um evento inicial nos carcinomas epidermóides de boca.

2.4 Retinoblastoma

O gene retinoblastoma é um supressor de tumor. Ele forma, juntamente com os genes p107 e RLB2, a família dos genes retinoblastoma. Esse gene foi primeiramente identificado em tumores malignos de retina associados a deleções na região cromossômica em que se localiza, em pacientes com história familiar desta doença (CLÁUDIO; TONINI; GIORDANO, 2002). O gene codifica uma fosfoproteína nuclear, chamada de proteína do retinoblastoma. Essa proteína exibe quantidade constante e abundante, apresentando apenas discreta variação, em todas as fases do ciclo celular. Porém, seu estado de fosforilação depende da fase em que o ciclo se encontra, e ela também é alvo da atividade enzimática dos complexos CDK/ciclina (CHEN et al., 1989).

A via do retinoblastoma responde em grande parte à presença ou à ausência de sinais mitogênicos. Assim, regula o ciclo celular por meio de múltiplas funções. Ela também regula outros processos que afetam a proliferação celular, a

diferenciação terminal e a apoptose (ADAMS; KAELIN Jr, 1998). A proteína do retinoblastoma pode inibir o crescimento da célula, atuando no ciclo celular entre as fases G0 e S, ligando-se e inativando fatores de transcrição. Essa proteína tem importante papel na diferenciação de vários tecidos, como adipogênese, miogênese e hematopoiese. A forma hipofosforilada ativa da proteína do retinoblastoma inibe a função apoptótica do interferon gama (INF- δ), e o fator de crescimento transformante beta1 (TGF- β 1) induz a apoptose suprimindo sua expressão. A proteína do retinoblastoma está presente em todas as células e tecidos, porém ela se encontra mutada em muitos tipos de câncer (CLÁUDIO; TONINI; GIORDANO, 2002).

Lingfei et al. (1998) notaram que, em 58 casos de carcinoma epidermóide de pulmão, 21 deles não exibiram expressão da proteína do retinoblastoma, 28 apresentaram expressão parcial e em apenas nove lesões a expressão foi normal. E Akin et al. (2002) observaram que, em 65 casos de carcinoma epidermóide de pulmão, 80% das ocorrências foram positivas para a proteína. No entanto, somente 40% dos tumores apresentaram mais da metade das células positivas. Nesse trabalho, não foi encontrada nenhuma relação entre as características clínicas dos pacientes e a expressão da proteína do retinoblastoma.

Ceccarelli et al. (1998) avaliaram a expressão da proteína do retinoblastoma em 153 carcinomas de mama. Os autores não encontraram diferenças estatísticas da expressão dessa proteína entre os pacientes que apresentaram metástase em relação aos que não a exibiram. Mas todos os casos que foram negativos ou apresentaram pouca expressão dessa proteína mostraram menor potencial de metástase. Outro dado obtido foi que a maioria dos tumores indiferenciados e com diferenciação moderada foi negativa para essa proteína. E os tumores que exibiram

maior capacidade proliferativa foram negativos para a expressão da proteína do retinoblastoma.

Ikeguchi et al. (2000) avaliaram a expressão da proteína do retinoblastoma em 191 casos de carcinoma primário de esôfago. Desse total, 171 pacientes eram homens e apenas 20 mulheres. Os autores consideraram positivos os tumores que exibiram mais de 50% das células marcadas. Como controle positivo, eles usaram o epitélio onde não havia neoplasia. Assim, 109 (57%) foram positivos. Entretanto, os autores notaram que a maioria dos tumores agressivos e com metástases em linfonodos foi negativa para a marcação da proteína. Em relação à sobrevida de cinco anos, 38% dos pacientes positivos para essa proteína sobreviveram mais que esse tempo. Enquanto nos negativos a taxa de sobrevida de cinco anos foi de 17%. Esses resultados indicam que a perda da expressão dessa proteína está diretamente relacionada com a progressão desses tumores.

Ambrosch et al. (2001) notaram que não houve diferença estatística quando comparada a expressão dessa proteína com o epitélio normal, leucoplasia com graus variados de atipia, carcinoma in situ e carcinoma epidermóide. Os autores avaliaram 57 casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, dos quais 13 eram de boca, 30 de orofaringe e 14 de hipofaringe. No total, 38 pacientes eram homens e 19 mulheres, com idade média de 57 anos. Enquanto todos os casos de mucosa normal foram positivos, apenas seis (11%) dos carcinomas epidermóides foram negativos. Os autores também acreditam que a perda da expressão da proteína do retinoblastoma independe da progressão do tumor em casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Nesse estudo, os autores não avaliaram o percentual de células marcadas.

Pavelic et al. (1996) estudaram a expressão da proteína do retinoblastoma em 182 carcinomas epidermóides de boca e compararam com 55 casos de tecidos, adjacentes à lesão, considerados normais. Dos 182 tumores, 75 foram considerados menores. Em todos os casos de tecido adjacente à lesão, a expressão foi normal. Dos 75 casos de menor tamanho, nove (7%) não exibiram expressão da proteína estudada. Já nos 107 casos restantes, 40 (37%) apresentaram a mesma condição. Segundo os autores, esses dados sugerem que a diminuição da expressão da proteína do retinoblastoma está associada à progressão desses tumores. Os autores também constataram neste artigo que a perda da expressão dessa proteína, em casos de câncer em estágio inicial, é um importante indicador de prognóstico.

Nakahara et al. (2000), ao trabalhar também com carcinoma epidermóide de boca, notaram que a proteína do retinoblastoma estava presente em 34 (43,6%) dos 78 casos estudados. Os autores compararam a expressão dessa proteína nos carcinomas e em lesões pré-malignas e concluíram que ela está relacionada com o desenvolvimento dessa lesão, mas não com sua progressão. Eles também constataram que as alterações na expressão dessa proteína, além de precoces, são freqüentes na tumorigênese dessas lesões.

2.5 HPV

Nas últimas décadas, devido aos avanços nas técnicas de biologia molecular, inúmeros trabalhos tentaram comprovar que o HPV também é um fator etiológico dos carcinomas de cabeça e pescoço (BRADFORD et al., 1991; CRUZ et al., 1996;

ELAMIN et al., 1998; LO MUZIO et al., 1997). O vírus do HPV está fortemente relacionado a vários tipos de câncer. Entretanto, não há comprovação de que ele participe da carcinogênese de lesões de boca. Estudos mais recentes mostram que apenas de 15% a 20% de todos os tipos de câncer estão vinculados a infecções pelo HPV (AZZIMONTI et al., 1999; HA et al., 2002; MERKELBACH-BRUSE et al., 1999).

Os HPVs pertencem a família papovavírus. São vírus de ácido desoxirribonucléico (DNA), circular de dupla hélice e com aproximadamente 55 nanômetros de diâmetro. Seu genoma é formado por 7.200 a 8.000 pares de bases e o material genético é envolto em uma cápsula protéica icosaédrica denominada capsídeo, que contém 72 capsômeros (KIRNBAUER et al., 1993; ZUR HAUSEN, 2000). Os HPVs são epiteliotróficos capazes de infectar a pele e as mucosas em vários sítios corporais (ZUR HAUSEN, 2000).

Para replicar seu material genético, esses vírus dependem da maquinaria celular do hospedeiro e podem alterar a regulação do ciclo celular normal. Essa ação está vinculada à síntese de duas oncoproteínas, a E6 e a E7. Juntas, essas oncoproteínas podem imortalizar células epiteliais e estimular sua proliferação por ativar as ciclinas, que estão envolvidas na via do ciclo da proteína do retinoblastoma (pRb) e na proteína p53 (p53), com um papel importante no desenvolvimento de tumores (POLJAK; SEMEI; GALE, 1998).

O genoma viral apresenta três segmentos principais de tamanhos desiguais. Cerca de 10% de seu material genético representa a Região Longa de Controle (LCR), cuja função é regular a expressão dos genes virais. Os outros segmentos são formados pelos genes Early (E) ou Late (L). Todos os genes virais são decodificados em uma fita de seu DNA. Os genes L1 e L2 codificam as proteínas capsídeas

principais e secundárias, que são expressas somente em células epiteliais diferenciadas (CHOW; BROKER, 1994). No gene L1, existe uma diferença muito pequena na seqüência básica de DNA nos diferentes tipos de HPV. No entanto, essa diferença permite identificar os vários tipos do vírus (SZENTIRMAY et al., 2005).

O gene HPV E1 codifica dois polipeptídios que se ligam a seqüências específicas dentro da LCR para iniciar a replicação do DNA viral. O gene HPV E2 expressa uma ou mais proteínas com comprimentos que vão de 370 a 430 aminoácidos. Essas proteínas atuam como ativadoras ou repressoras na transcrição e, assim, regulam a transcrição e a replicação do DNA viral (MCBRIDGE; ROMNCZUK; HOWLEY, 1991; MCKAIG; BARIC; OLSAN, 1998). O gene HPV E4 é expresso relativamente tarde na replicação do vírus e está envolvido na maturação e na liberação de partículas do papilomavírus. O gene HPV E4 interage com as citoqueratinas. O resultado dessa interação é o colapso dos filamentos citoplasmáticos intermediários, o que leva a alterações citomorfológicas específicas do HPV, como coilocitose, por exemplo, nas células epiteliais infectadas (DOORBAR et al., 1991; ROBERTS et al., 1993). O gene HPV E5, em circunstâncias experimentais, funciona como oncogene. Esse gene tem a capacidade de transformar, *in vitro*, algumas linhagens de células de roedores por inibir a degradação fisiológica de receptores de membrana celular para fatores de crescimento (CHEN; MOUNTS, 1990; PETTI; DIMAIO, 1994). Ainda não está clara a função exata da proteína E5 em câncer humano. Ela não é expressa na maioria dos tipos de câncer HPV positivos (SZENTIRMAY et al., 2005).

Os genes HPV E6 e E7 são os principais genes virais responsáveis pela transformação maligna celular. Esses oncogenes codificam duas proteínas com,

respectivamente, 151 e 98 aminoácidos. As proteínas E6 e E7, em conjunto, podem imortalizar queratinócitos de vários sítios do corpo humano (MUNGER et al., 1989; SCHEFFNER et al., 1994). A proteína E6 pode formar um complexo com a proteína p53 da célula do hospedeiro e degradar essa proteína (CROOK; TIDY; VOUSDEN, 1991; HUBBERT; SEDMAN; SCHILLER, 1992; WERNESS; LEVINE; HOWLEY, 1990). O gene TP53 tem funções fundamentais na célula – regula o crescimento celular, o reparo do DNA, a apoptose, a supressão tumoral, a angiogênese e a auto-regulação, entre outras. A perda da função do gene TP53 gera a desregulação do ciclo celular e promove mutação, instabilidade cromossômica e transformação maligna na célula do hospedeiro. A proteína E6 também pode ativar a proteína telomerase, o que é essencial para a célula tornar-se imortal (KLINGELHUTZ; FOSTER; MCDUGAL, 1996; VOUSDEN; LU, 2002).

A proteína E7 forma complexos com a família das proteínas do gene RB – pRb1, p107 e p130 –, que regulam negativamente o ciclo celular. A pRb1 regula a progressão do ciclo celular inibindo fatores de transcrição, como E2F. Essa proteína é fosforilada pelas quinases dependentes de ciclinas, e a pRb hipofosforilada pode ajudar a bloquear a progressão do ciclo celular. As outras proteínas RB – 107 e 130 – regulam check points diferentes no ciclo celular, como a passagem de G0 para G1 e de G1 para S. O gene HPV E7 produz ligantes para as formas hipofosforiladas da pRb, p107 e p130 e libera, no interior da célula, o fator de transcrição E2F. Esse fator de transcrição livre no interior celular induz a expressão de muitos genes envolvidos na progressão do ciclo celular. Dessa forma, as proteínas E6 e E7 inativam as proteínas p53 e pRb e permitem que a célula escape dos check points normais, o que pode levar à perda de fidelidade na replicação do DNA (COBRINIK et al., 1992; MCKAIG; BARIC; OLSHAN, 1998). Os efeitos simultâneos de perda de

função do TP53 e da pRb podem levar células epiteliais a se malignizarem (SZENTIRMAY et al., 2005).

Ha et al. (2002) avaliaram, pela técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real (Real Time Quantitative PCR), a presença do HPV em lesões de cabeça e pescoço. Foram analisados 102 pacientes com lesões pré-malignas, das quais 85 eram em boca, com variados graus de atipia, e 34 pacientes com carcinoma epidermóide de boca. Em apenas duas lesões, nos dois grupos estudados, os autores encontraram material genético do HPV. Uma no grupo das leucoplasias, especificamente em uma leucoplasia com moderado grau de atipia, localizada em cavidade bucal – o que representa 0,98% das lesões estudadas –, e a outra no grupo de carcinoma epidermóide – 2,9% do total. Os autores acreditam que o baixo número de lesões positivas para o HPV se deve ao fato de as lesões analisadas localizarem-se na boca. Nessa região do corpo ainda é contraditória a função do HPV como fator etiológico. Outra possibilidade que eles apontam é que o DNA extraído de tecido parafinado não seja de boa qualidade. Entretanto, apenas 11 dos 34 casos por eles estudados estavam armazenados em parafina. Os autores acreditam que a ausência do HPV pode ser mais predominante em lesões de boca. E ainda: que o HPV pode ser um agente etiológico de tumores epiteliais em outras regiões do corpo.

Dahlgren et al. (2004) estudaram, pela técnica de PCR, a presença do HPV em 110 carcinomas epidermóides de língua. Do total, 25 tumores localizavam-se na base da língua e os outros 85 na região móvel da língua (borda, ventre e ápice lingual). Eles encontraram o DNA do HPV em 12 (10,9%) lesões, das quais 10 (40%) positivas estavam localizadas na base da língua. Enquanto isso, das 85 lesões da parte móvel da língua, apenas duas (2,4%) foram positivas. Os autores constataram, ainda, que a presença do DNA do HPV foi mais freqüente em tumores

indiferenciados quando comparados com tumores moderadamente diferenciados e bem diferenciados. Também em lesões menores (T1 e T2) o material genético do vírus estava presente em um número maior delas quando comparadas com lesões maiores (T3 e T4). Outro dado interessante foi que o tempo de recorrência nos pacientes positivos para HPV foi maior. No grupo de pacientes com tumor na base da língua, o tempo de recorrência também foi diferente nas lesões com HPV positivo e negativo. Nos casos positivos, a média foi de 17 meses. Nos negativos, de oito meses. Eles notaram que a sobrevida foi significativamente maior nesse grupo de pacientes HPV positivos. Esses autores acreditam que a presença do HPV em lesões malignas de boca depende, significativamente, da localização.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho foi estudar a expressão imunoistoquímica das proteínas ciclina D1, do fator de transcrição c-jun e da proteína do retinoblastoma. Tentou-se ainda verificar, por meio de testes estatísticos, a relação dessas proteínas com os graus de malignidade do carcinoma epidermóide bucal. O objetivo era também verificar, pela técnica de PCR, se o HPV é um agente etiológico dessa neoplasia.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado, em 05/10/2004, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo com o número do protocolo do parecer 162/04 (Anexo A).

A pesquisa corresponde a uma parte do projeto intitulado “DETECÇÃO DO PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA E LEUCOPLASIAS UTILIZANDO-SE HIBRIDIZAÇÃO *in situ* E PCR. RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DA CICLINA D1, FATOR DE TRANSCRIÇÃO C-JUN E COM A PROTEÍNA DO RETINOBLASTOMA”, de responsabilidade da professora Dra. Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa.

4.1 Seleção dos casos e análise morfológica

Para o estudo, foram selecionados 63 casos de carcinoma epidermóide bucal do Laboratório de Patologia Cirúrgica da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da FOU SP. As lâminas referentes aos casos e coradas pela técnica da hematoxilina e eosina foram submetidas novamente a um estudo morfológico em microscopia de luz para confirmação do diagnóstico e classificação do grau de malignidade.

4.1.1 Dados epidemiológicos dos pacientes estudados

Dos 63 pacientes analisados, 46 eram do sexo masculino e 17 do sexo feminino. A idade variou de 17 a 85 anos, com média de 53,2 anos. Porém, entre os pacientes do sexo masculino a idade variou de 22 a 85 anos, com média de 52,6 anos. Entre pacientes do sexo feminino, a idade variou de 17 a 84 anos, com média de 54,8 anos. Em relação à cor da pele, 41 eram leucodermas, 13 melanodermas, um xantoderma e oito não tinham essa característica relatada na ficha. De acordo com a localização anatômica da lesão, 10 estavam situadas no assoalho da boca, uma na gengiva, duas no lábio inferior, uma no lábio superior, 24 na língua, uma na mandíbula, uma na mucosa jugal, oito no palato, nove no rebordo alveolar e seis em trígono-retromolar.

Tabela 4.1 – Dados epidemiológicos dos pacientes estudados

N.º	N.º do Exame	Sexo	Idade	Cor da pele	Localização
1	52748	M	51	Melanoderma	Trígono
2	52549	M	58	Leucoderma	Palato
3	52500	F	52	/	Palato
4	52481	M	59	Leucoderma	Assoalho
5	51955	M	52	Leucoderma	Palato
6	51933	M	65	Leucoderma	Palato
7	51911	M	47	Melanoderma	Assoalho
8	51904	M	77	Leucoderma	Trígono
9	51882	M	47	/	Língua
10	51541	M	50	Leucoderma	Língua
11	51496	F	54	Leucoderma	Rebordo alveolar
12	51439	M	48	Leucoderma	Língua
13	51437	M	59	Melanoderma	Língua
14	51415	F	/	/	Rebordo alveolar

Continua

Continuação

15	51412	M	42	Leucoderma	Assoalho
16	51402	M	/	Leucoderma	Lábio superior
17	51397	M	55	Leucoderma	Rebordo alveolar
18	51341	M	69	Leucoderma	Rebordo alveolar
19	51176	M	/	Melanoderma	Trígono
20	51089	F	49	Melanoderma	Língua
21	51037	M	59	Xantoderma	Língua
22	51011	M	75	/	Língua
23	50844	M	47	Melanoderma	Língua
24	50831	M	54	Leucoderma	Língua
25	50813	M	22	Leucoderma	Língua
26	50807	M	58	/	Palato
27	50741	M	51	Leucoderma	Língua
28	50539	M	42	Leucoderma	Língua
29	50444	M	47	/	Rebordo alveolar
30	50234	F	46	Leucoderma	Língua
31	49796	M	40	Leucoderma	Língua
32	49438	M	50	Leucoderma	Língua
33	49416	M	50	Leucoderma	Assoalho
34	49250	M	49	Leucoderma	Mandíbula
35	48812	M	42	Leucoderma	Trígono
36	48377	F	62	Leucoderma	Língua
37	48163	F	56	Leucoderma	Assoalho
38	47454	F	37	Leucoderma	Língua
39	47317	M	48	/	Assoalho
40	46728	F	84	Leucoderma	Palato
41	46724	M	49	Melanoderma	Trígono
42	46716	F	66	Leucoderma	Palato
43	46686	M	40	Leucoderma	Assoalho
44	46144	M	42	Leucoderma	Assoalho
45	45909	M	50	Melanoderma	Rebordo alveolar
46	45908	F	35	/	Língua
47	45842	M	36	Melanoderma	Língua
48	45706	M	48	Leucoderma	Língua
49	45632	M	52	Leucoderma	Palato
50	45607	F	73	Melanoderma	Assoalho
51	45546	M	85	Leucoderma	Assoalho
52	45100	M	74	Leucoderma	Lábio inferior
53	44925	M	48	Leucoderma	Rebordo alveolar

Continua

Conclusão					
54	44557	F	70	Leucoderma	Língua
55	42729	M	41	Leucoderma	Língua
56	41333	F	17	Leucoderma	Trígono
57	40458	M	40	Leucoderma	Gengiva
58	40145	M	63	Leucoderma	Língua
59	39210	F	48	Melanoderma	Mucosa jugal
60	38647	F	56	Melanoderma	Rebordo alveolar
61	38217	F	72	Leucoderma	Língua
62	38063	M	67	Leucoderma	Lábio inferior
63	35338	M	67	Melanoderma	Rebordo alveolar

Tabela 4.2 – Número e porcentagem dos pacientes de acordo com o sexo

Sexo	N.º (%)
Masculino	46 (73%)
Feminino	17 (27%)
Total	63 (100%)

Tabela 4.3 – Número e porcentagem dos pacientes de acordo com a cor da pele

Cor da pele	N.º (%)
Leucoderma	41 (65%)
Melanoderma	13 (20,5%)
Xantoderma	01 (1,5%)
Ignorada	08 (13%)
Total	63 (100%)

Tabela 4.4 – Número e porcentagem dos pacientes de acordo com a localização anatômica das lesões

Localização anatômica	N.º (%)
Assoalho	10 (15,5%)
Gengiva	01 (1,5%)
Lábio inferior	02 (3%)
Lábio superior	01 (1,5%)
Língua	24 (38,5%)

Continua

Conclusão	
Mandíbula	01 (1,5%)
Mucosa jugal	01 (1,5%)
Palato	08 (13%)
Rebordo alveolar	09 (14,5%)
Trígono	06 (9,5%)
Total	63 (100%)

4.2 Gradação histológica de malignidade

Os casos foram divididos em dois grupos: alto grau de malignidade e baixo grau de malignidade, de acordo com os critérios de Anneroth et al. (1987), modificados por Pinto Jr. (1991). Esses critérios consistem em avaliar seis características morfológicas das lesões: grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, números de mitoses, padrão de invasão, estágio de invasão e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (ANNEROTH et al.,1987). Porém, por tratar-se de biópsias incisivas, o estágio de invasão não foi avaliado (PINTO Jr., 1991).

De acordo com esses critérios, cada estágio recebe nota de 1 a 4. A média é obtida pela somatória dos pontos de cada parâmetro, dividida pelo número de parâmetros usados. Assim, a pontuação média nunca pode ser maior que 4 nem menor que 1. As lesões são consideradas de baixo grau de malignidade quando recebem escores de 1 a 2,5, e de alto grau de malignidade, de 2,6 a 4.

Tabela 4.5 – Sistema de gradação histológica

POPULAÇÃO CELULAR TUMORAL				
Pontos (escores)				
Parâmetros	1	2	3	4
morfológicos				
Grau de queratinização	Intenso (mais de 50% das células)	Moderado (entre 20% e 50% das células)	Mínimo (entre 5% e 20% das células)	Ausente (entre 0% e 5% das células maduras)
Pleomorfismo nuclear	Discreto (mais de 75% das células maduras)	Moderado (entre 50% e 75% das células maduras)	Abundante (entre 25% e 50% das células maduras)	Intenso (entre 0% e 2% das células maduras)
Número de mitoses	0-1	2-3	3-4	Mais de 5
RELAÇÃO TUMOR HOSPEDEIRO				
Pontos (escores)				
Parâmetros	1	2	3	4
morfológicos				
Padrão de invasão	Margens bem definidas	Cordões sólidos e/ou ilhas	Pequenos grupos celulares	Invasão maciça
Infiltrado linfoplasmocitário	Marcante	Moderado	Discreto	Ausente

4.3 Técnica de imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica foi a mesma utilizada rotineiramente no Laboratório de Imunoistoquímica da disciplina de Patologia Bucal da FOU SP. Foram utilizados cortes de 3 micra de espessura no material emblocado em parafina e estendidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto, secas e

mergulhadas durante 1 minuto em solução de 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA) a 10% em álcool absoluto. Os primeiros passos foram iguais para os três anticorpos. Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol, um a 60° C durante 30 minutos e outro à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foram reidratados em série descendente de etanol, com três passagens em etanol absoluto, seguidas por etanol 95% e 85% durante 5 minutos cada uma. Com a finalidade de remover o pigmento formólico, os cortes foram imersos em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica a 95% durante 10 minutos. Posteriormente, foram lavados em água corrente por 10 minutos e submetidos a dois banhos em água destilada de 5 minutos cada uma.

4.3.1 Imunoistoquímica da proteína ciclina D1

Os cortes receberam tratamento para recuperação antigênica com tampão citrato a 10mM, pH 6.0 por 30 minutos em banho-maria. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com dois banhos de 15 minutos cada um em solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol (1:1 v/v). Os cortes foram encubados por 60 minutos com o anticorpo primário anticiclina D1 (clone DCS-6, Dako Corporation, Glostrup, Denmark) em temperatura ambiente, na diluição de 1:50. As secções foram encubadas em um ciclo de kit EnVision Mouse (Dako Corporation) por 30 minutos para bloqueio da biotina endógena e lavadas com TBST pH 6.0. A reação de revelação foi o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-

diaminobenzidina, Sigms Chemical Co., St. Louis, MO/USA). Após a lavagem, os cortes foram contra-corados com a hematoxilina de Mayer.

4.3.2 Imunoistoquímica da proteína c-jun

Os cortes receberam tratamento para recuperação antigênica com tampão citrato a 10 mM, pH 6.0 por 30 minutos em banho-maria. O bloqueio da peroxidase endógena foi com dois banhos de 5 minutos cada um em solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol (1:1 v/v). Os cortes foram incubados com dois ciclos de 15 minutos cada um com o Avidin/Biotin Blocking Kit – SP 2001 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) e por 75 minutos com BSA 0,1% (BSA-Bioset S/A, São Paulo, Brasil) antes da adição do anticorpo primário anti-c-jun (Clone 94, Santa Cruz, CA) em temperatura ambiente, na diluição de 1:50. As secções foram incubadas com quatro ciclos de kit CSA System Peroxidase (Calalyzed Signal Amplification, Dako Corporation, Carpinteria, CA) por 15 minutos cada um e lavadas com TBST pH 7.4. Os cortes foram lavados novamente com TBST pH 7.4 e a reação de revelação foi o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Sigms Chemical Co., St. Louis, MO/USA). Depois da lavagem, os cortes foram contra-corados com a hematoxilina de Mayer.

4.3.3 Imunoistoquímica da proteína do retinoblastoma

Os cortes receberam tratamento para recuperação antigênica com tampão citrato a 10 mM, pH 6.0 por 30 minutos em banho-maria. O bloqueio da peroxidase endógena foi com dois banhos de 15 minutos cada um em solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol (1:1 v/v). Os cortes foram incubados com dois ciclos de 15 minutos cada um com o Avidin/Biotin Blocking Kit – SP 2001 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) e por 75 minutos com BSA 0,1% (BSA-Bioset S/A, São Paulo, Brasil) antes da adição do anticorpo primário anti-RB (Clone RB-1, Dako Corporation, Glostrup, Damark) em temperatura ambiente, na diluição de 1:25. As secções foram incubadas com quatro ciclos de kit CSA System Peroxidase (Calalyzed Signal Amplification, Dako Corporation, Carpinteria, CA) por 15 minutos cada um e lavadas com TBST pH 7.4. Os cortes foram lavados novamente com TBST pH 7.4 e a reação de revelação foi o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Sigms Chemical Co., St. Louis, MO/USA). Depois da lavagem, os cortes foram contra-corados com a hematoxilina de Mayer.

4.4 Detecção de DNA de HPV por PCR

4.4.1 Preparo dos cortes para os casos emblocados em parafina e digestão enzimática

Foram obtidos de 10 a 20 cortes de 10 micra do material embocado em parafina. O material foi depositado em tubos de 1,5 ml. Em seguida, foi adicionado aos tubos 1 ml de xilol aquecido a 65° C, mantidos por 10 minutos em estufa aquecida. Os tubos foram então centrifugados a 10.000 rpm durante 3 minutos, desprezado o sobrenadante, processo seguido por novas trocas de xilol aquecido, até a remoção completa da parafina. O corpo de fundo de tecido foi hidratado em cadeia descendente de etanol (etanol absoluto, etanol 95%, etanol 85% e etanol 70% em água milli-Q). Cada troca foi precedida de homogeneização e centrifugação a 10.000 rpm durante 3 minutos em temperatura ambiente. Os corpos de fundo foram submetidos à digestão enzimática com proteinase K.

Foi adicionado ao corpo de fundo de 200 a 400 µl de tampão de lise estéril (NaCl 1M; Tris-HCL 1M, pH 8; EDTA 0,5M, pH 8; SDS 10%) (Sigma Chemical, St. Louis, MO/USA) e proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) na concentração final de 500 µg/ml. Os tubos foram mantidos a 55° C em banho-maria por três a cinco dias até a completa dissolução do corpo de fundo do tecido. Foi adicionada proteinase K (de 10 a 30 µl na concentração de 250 µg/ml) em intervalos de 24 horas e os tubos foram invertidos pelo menos uma vez ao dia. Para inativação da proteinase K, os tubos foram incubados a 95° C durante 10 minutos.

4.4.2 Extração do DNA

A extração de DNA nos casos em estudo foi feita pelo método de acetato de amônio e de isopropanol, padronizado em laboratório (NEVES et al.,2002).

Foram adicionados 200 µl de acetato de amônio a quatro molar (Synth, BR) no tubo contendo o lisado, para precipitação da proteína. O tubo foi agitado por 20 segundos em velocidade máxima, incubado em gelo durante 5 minutos e centrifugado a 15,000 x g por 3 minutos. A proteína precipitada foi observada como um corpo no fundo do tubo. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para outro tubo. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 600 µl de isopropanol, homogeneizados e centrifugados a 15,000 x g por 5 minutos. O corpo de fundo de DNA obtido foi lavado com etanol 70% e centrifugado a 16,000 x g por 1 minuto. Em seguida, foi removido o álcool e, após a evaporação do etanol 70% em temperatura ambiente, o corpo de fundo de DNA foi dissolvido em 30 a 50 µl de tampão TE (Tris-HCL 10 mM, pH 7,4 e EDTA 1 mM, pH 8) e mantido a 4° C até a quantificação e a utilização para a PCR.

4.4.3 PCR

Todas as reações foram feitas em tubos para PCR de 0,5 ml adicionando-se: tampão de PCR 1X (Tris-HCL 200 mM, pH 8,4; KCl 500 mM) (Invitrogen), dNTP 0,3 mM (2'-deoxinucleotídeos 5'-trifosfato, dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Invitrogen),

MgCl₂ (Invitrogen), iniciadores senso e anti-senso (Invitrogen), Taq DNA 2U (Invitrogen), de 100 a 300 nanogramas de DNA genômico, e H₂O estéril para um volume final de 25 µl.

Desnaturação inicial a 94° C (3 minutos), seguida de 35 ou 40 ciclos de desnaturação a 94° C (1 minuto), associação (50 segundos), extensão a 72° C (1 minuto) e extensão final de 72° C (7 minutos).

Tentou-se amplificar o DNA obtido pela técnica de PCR. A seqüência para os iniciadores do HPV, de início, foram usados os primers GP5+ e GP6+, que amplificam parte da região L1 do vírus, comum a mais de 22 tipos de HPV, entre eles os tipos 16, 18, 31, 33 e 35 (de RODA HUSMAN et al., 1995).

Em todos os experimentos de PCR foram incluídos um controle positivo e um controle negativo, constituído por todos os reagentes utilizados na reação e eliminação do DNA. Foi utilizado como controle positivo um caso de condiloma acuminado.

A amplificação do DNA genômico pela PCR foi visualizada por meio da eletroforese do DNA amplificado (100 Volts por 30 minutos) em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídeo (0,5 g/ml) e utilizando-se uma cuba horizontal com tampão de corrida TAE 1x, pH 8,1. Para visualização e documentação do gel de amplificação do DNA, foram utilizados um transluminador de luz ultravioleta (UV) (Fotodyne, Inc.) e uma câmara fotográfica tipo polaróide (Fisher Biotech). Em todos os géis foi colocado, juntamente com as amostras para análise, um marcador de pares de base (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen), que representa uma mistura equimolar de fragmentos de DNA de 2.000 a 100 pb.

4.5 Análise quantitativa da expressão das proteínas ciclina D1, c-jun e proteína do retinoblastoma

A análise quantitativa das células positivas para as proteínas estudadas foi realizada por apenas um observador. As células consideradas positivas foram as que exibiram marcação nuclear de coloração acastanhada. A intensidade da marcação não foi avaliada.

As imagens de cada campo foram obtidas por um microscópio de luz, com aumento final de 400 vezes, sob um foco fixo com clareza de campo. Em seguida, as imagens foram transferidas para um monitor de TV conectado a um sistema computadorizado, no qual foi realizada a contagem manual dos núcleos que expressavam as proteínas. Cada proteína foi contada separadamente pelo software Imagelab-Softium.

O sistema computadorizado consiste em um computador Pentium 200MHz com placa de aquisição de imagem captivator. As imagens do campo obtidas em um microscópio Laborlux-Leitz, acoplado a um sistema de câmeras JVC modelo TK 870 U, foram transferidas para um monitor de TV Multisystem M700. O software Imagelab-Softium foi desenvolvido no Laboratório de Informática Dedicado a Odontologia (Lido), da disciplina de Patologia Geral do Departamento de Estomatologia da FOUSP.

A contagem manual das proteínas estudadas foi realizada de acordo com os núcleos positivos em 500 células. Os campos eleitos para a contagem foram selecionados aleatoriamente. A expressão das proteínas foi considerada em relação

ao percentual absoluto das células positivas por causa da finalidade da análise estatística.

4.6 Análise estatística

Com o objetivo de comparar estatisticamente a expressão das proteínas estudadas entre os grupos de alto grau de malignidade e de baixo grau de malignidade, dois a dois, entre os mesmos anticorpos, usou-se o teste t de Student. E para comparar a expressão de todas as proteínas estudadas os dados obtidos foram submetidos a análise de variância ANOVA um critério e ao teste de Tukey.

Para realização da análise utilizou-se o software BioEstat versão 3.0.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos histológicos do carcinoma epidermóide bucal

Dos 63 casos estudados, 27 foram classificados como de alto grau de malignidade e 36 de baixo grau de malignidade. Histologicamente, as células dos carcinomas epidermóides bucais de alto grau de malignidade caracterizavam-se, em geral, pela invasão do tecido conjuntivo em ninhos sólidos, com intenso pleomorfismo nuclear, muitas mitoses atípicas e ausência de pontes intercelulares (Figura 5.1). Os carcinomas epidermóides bucais de baixo grau de malignidade, na maioria das vezes, invadiam o tecido subjacente na forma de ilhas e cordões que formavam muitas pérolas córneas, queratinizações individuais com pontes intercelulares e poucas mitoses (Figura 5.2).

5.2 Expressão imunoistoquímica da ciclina D1

A expressão imunoistoquímica da ciclina D1, observando os casos individualmente, mostrou áreas de total ausência, campos com marcação abundante e regiões com marcação em células isoladas. A intensidade da marcação também variou nos casos estudados. Geralmente, a expressão dessa proteína ocorreu nas

regiões periféricas, mas em alguns casos houve também marcações em células nas regiões centrais (Figura 5.3).

Dos casos estudados, seis (9,5%) exibiram menos de 1% das células marcadas. Desses seis, dois foram graduados como de alto grau de malignidade e quatro de baixo grau de malignidade. Em 33 (52,4%) casos, houve marcação igual ou superior a 20%. Em sete (11,1%), a marcação foi igual ou superior a 50% das células. Entretanto, a expressão da ciclina D1 nos casos de baixo grau de malignidade variou de 0% a 86,8%, com média de 26%. Nos casos de alto grau de malignidade, a variação da expressão foi de 0% a 88,2%, com média de 22,2%.

A análise estatística realizada para comparar a expressão da proteína ciclina D1, nos dois grupos de carcinoma, mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Gráfico 5.1).

5.3 Expressão imunoistoquímica da c-jun

A expressão imunoistoquímica da proteína c-jun também mostrou um padrão de marcação variado. Os casos exibiram regiões de abundante marcação, contrastando com áreas sem nenhuma marcação e até campos com células isoladas que exibiram expressão dessa proteína, mas, em geral, na região das pérolas córneas as células periféricas não exibiram marcação (Figura 5.4).

Dos casos analisados, sete (11,1%) exibiram marcação em menos de 1% das células. Desses sete casos, um foi graduado como de baixo grau de malignidade e seis de alto grau de malignidade. Além disso, 42 (66,6%) dos casos exibiram

marcação igual ou superior a 20% e em 20 (31,7%) casos a marcação foi igual ou superior a 50%. A variação da proteína c-jun nos casos de baixo grau de malignidade foi de 0% a 98,6%, com média de 41,6%. Nos casos de alto grau de malignidade, a marcação variou de 0% a 91%, com média de 32,6%.

A análise estatística realizada para comparar a expressão da proteína c-jun nos dois grupos de carcinoma mostrou que também não houve diferença significativa ($p>0,05$) (Gráfico 5.1).

5.4 Expressão imunoistoquímica da proteína do retinoblastoma

A expressão imunoistoquímica da proteína pRb mostrou-se levemente mais uniforme. Porém, em áreas específicas notava-se marcação variada, com regiões com grande quantidade de células marcadas, outras com ausência de marcação e áreas com algumas células marcadas isoladamente (Figura 5.5).

Em 10 (15,5%) dos casos estudados, menos de 1% das células apresentaram marcação. Apenas um foi classificado de baixo grau de malignidade e nove de alto grau de malignidade. Ao mesmo tempo, 33 (52,4%) dos casos tiveram mais de 20% das células marcadas e 14 (22,2%) exibiram marcação em mais de 50% das células. A marcação da proteína do retinoblastoma variou de 0% a 96,6%, com média de 39,2%, nos casos de baixo grau de malignidade. Nos casos de alto grau de malignidade, a variação da marcação foi de 0% a 71,4%, com média de 19,3%.

A análise estatística realizada para comparar a expressão da proteína pRb, nos dois grupos de carcinoma, mostrou que houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Gráfico 5.1).

5.5 Análise de variância

A análise de variância ANOVA um critério (Tukey) mostrou que houve diferença estatística ($p < 0,05$) apenas entre a expressão da ciclina D1 nos casos de alto grau de malignidade e da c-jun nos de baixo grau de malignidade; da pRb nos casos de alto grau de malignidade e da c-jun nos casos de baixo grau de malignidade e da pRb nos dois grupos estudados. Em todos os outros grupos estudados, a análise de variância não mostrou diferença estatística ($p > 0,05$). Quando o objetivo foi comparar a expressão do mesmo anticorpo entre os carcinomas de baixo e de alto grau de malignidade, o teste usado foi t de student e neste só houve diferença estatística entre a expressão da pRB.

5.6 Amplificação para o HPV

Apenas o controle positivo amplificou para o DNA do HPV (Figura 6). Os casos de carcinoma epidermóide bucal foram todos negativos (Figura 5.6), porém todos eles amplificaram para o gene constitutivo (Figura 5.7).

Tabela 5.1 – Lesões de baixo grau de malignidade. Número e percentual de células marcadas e grau histológico de malignidade (GHM)

N.º	N.º do Exame	Ciclina D1	C-jun	pRb	GHM
1	52500	51 (10,2%)	156 (31,2%)	153 (30,6%)	2
2	52481	109 (21,8%)	0 (0%)	93 (18,6%)	1,8
3	51911	0 (0%)	119 (23,8%)	0 (0%)	1,6
4	51496	206 (41,2%)	220 (44%)	23 (4,6%)	1,4
5	51415	65 (13%)	142 (28,4%)	60 (12%)	1,6
6	51397	101 (20,2%)	33 (6,6%)	156 (31,2%)	1,8
7	51341	88 (17,6%)	184 (36,8%)	80 (16%)	1,6
8	51176	27 (5,4%)	76 (15,2%)	78 (15,6%)	1,2
9	51089	236 (47,2%)	248 (49,6%)	77 (15,4%)	1,4
10	51037	110 (22%)	169 (33,8%)	233 (46,6%)	2,2
11	50844	136 (27,2%)	174 (34,8%)	166 (33,2%)	1,8
12	50813	113 (22,6%)	38 (7,6%)	234 (46,8%)	1,2
13	50741	61 (12,2%)	30 (6%)	122 (24,4%)	1,6
14	50539	142 (28,4%)	150 (30%)	27 (5,4%)	1,6
15	50234	181 (36,2%)	290 (58%)	250 (50%)	1,4
16	49796	0 (0%)	300 (60%)	210 (42%)	2,2
17	49438	240 (48%)	260 (52%)	350 (70%)	1,6
18	49416	0 (0%)	377 (75,4%)	165 (33%)	1,6
19	49250	167 (33,4%)	344 (68,8)	232 (46,4%)	2,2
20	48377	74 (14,8%)	110 (22%)	136 (27,2%)	1,6
21	48163	147 (29,4%)	57 (11,4%)	30 (6%)	1,6
22	47454	117 (23,4%)	45 (9%)	40 (8%)	2,2
23	46728	224 (44,8%)	246 (49,2%)	230 (46%)	2
24	46724	140 (28%)	283 (56,6%)	132 (26,4%)	1,8
25	46716	0 (0%)	421 (84,2%)	5 (1%)	1,6
26	45909	238 (47,6%)	459 (91,8%)	202 (40,4%)	1,8
27	45908	102 (20,4%)	35 (7%)	238 (47,6%)	2,4
28	44925	281 (56,2%)	32 (6,4%)	265 (53%)	2,4
29	44557	83 (16,6%)	493 (98,6%)	201 (40,2%)	1,8
30	42729	217 (43,4%)	451 (90,2%)	457 (91,4%)	1,6
31	40458	434 (86,8%)	305 (61%)	397 (79,4%)	2,2
32	39210	178 (35,6%)	431 (86,2%)	471 (94,2%)	1,6
33	38647	156 (31,2%)	232 (46,4%)	461 (92,2%)	1,4
34	38217	228 (45,6%)	471 94,2%)	483 (96,6%)	1,8
35	38063	11 (2,2%)	10 (2%)	167 (33,4%)	2
36	35338	21 (4,2%)	104 (20,8%)	428 (85,6%)	2

Tabela 5.2 – Lesões de alto grau de malignidade. Número e percentual de células marcadas e grau histológico de malignidade (GHM)

N.º	N.º do Exame	Ciclina D1	C-jun	pRb	GHM
1	52748	13 (2,6%)	157 (31,4%)	2 (0,4%)	2,6
2	52549	48 (9,6%)	108 (21,6%)	89 (17,8%)	2,8
3	51955	48 (9,6%)	0 (0%)	0 (0%)	2,6
4	51933	78 (15,6%)	180 (36%)	81 (16,2%)	2,6
5	51904	18 (3,6%)	0 (0%)	0 (0%)	3,4
6	51882	5 (1%)	24 (4,8%)	83 (16,6%)	3
7	51541	263 (52,6%)	02 (0,4%)	263 (52,6%)	3
8	51439	71 (14,2%)	90 (18%)	36 (7,2%)	2,6
9	51437	45 (9%)	0 (0%)	58 (11,6%)	2,6
10	51412	86 (17,2%)	86 (17,2%)	267 (53,4%)	2,8
11	51402	2 (0,4%)	79 (15,8%)	2 (0,4%)	3
12	51011	155 (31%)	165 (33%)	21 (4,2%)	2,6
13	50831	48 (9,6%)	102 (20,4%)	0 (0%)	3
14	50807	43 (8,6%)	147 (29,4%)	0 (0%)	2,6
15	50444	115 (23%)	0 (0%)	134 (26,8%)	2,8
16	48812	29 (5,8%)	0 (0%)	0 (0%)	2,8
17	47317	20 (4%)	327 (65,4%)	48 (9,6%)	2,6
18	46686	15 (3%)	378 (75,6%)	10 (2%)	2,8
19	46144	322 (64,4%)	455 (91%)	78 (15,6%)	3,2
20	45842	204 (40,8%)	150 (30%)	357 (71,4%)	2,8
21	45706	121 (24,2%)	52 (10,4%)	164 (32,8%)	2,6
22	45632	0 (0%)	112 (22,4%)	0 (0%)	2,8
23	45607	119 (23,8%)	274 (54,8%)	0 (0%)	3,2
24	45546	252 (50,4%)	291 (58,2%)	349 (69,8%)	2,8
25	45100	66 (13,2%)	437 (87,4%)	236 (47,2%)	3
26	41333	374 (74,8%)	381 (76,2%)	10 (2%)	3,6
27	40145	441 (88,2%)	404 (80,8%)	319 (63,8%)	3

Tabela 5.3 – Mostrando o número médio de células marcadas para cada proteína estudada dividido pelos grupos analisados.

	CD1 de alto grau de malignidade	c-jun de alto grau de malignidade	pRb de alto grau de malignidade	CD1 de baixo grau de malignidade	c-jun de baixo grau de malignidade	PRb de baixo grau de malignidade
Média	111	163	96.5	130.1	208.1	195.8

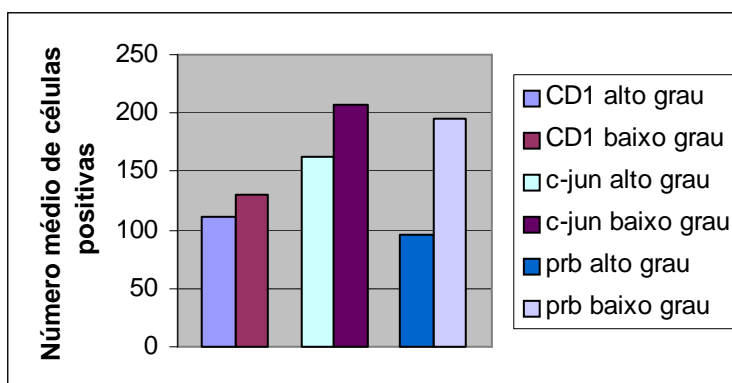


Gráfico 5.1- Número médio de células positivas para cada proteína estudada. As colunas da direita representam os casos de alto grau de malignidade e as da esquerda os de baixo grau de malignidade

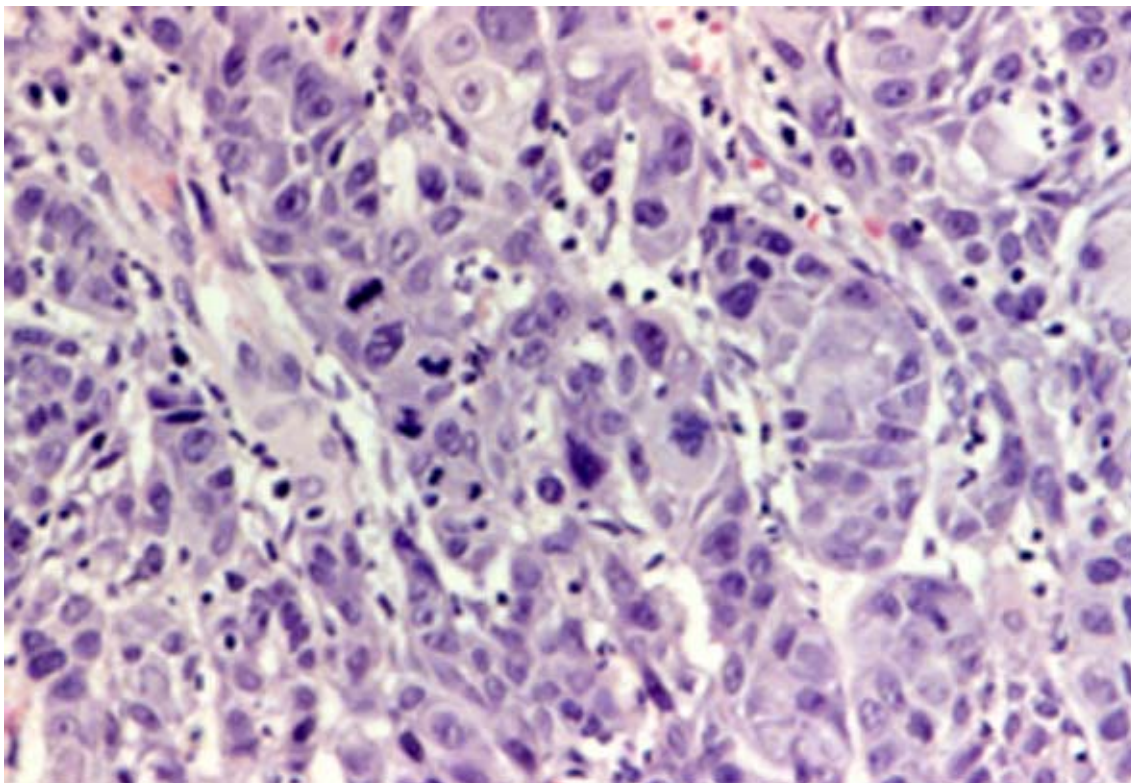


Figura 5.1 – Carcinoma epidermóide de alto grau de malignidade. Observar invasão maciça do tecido conjuntivo e células com intenso pleomorfismo

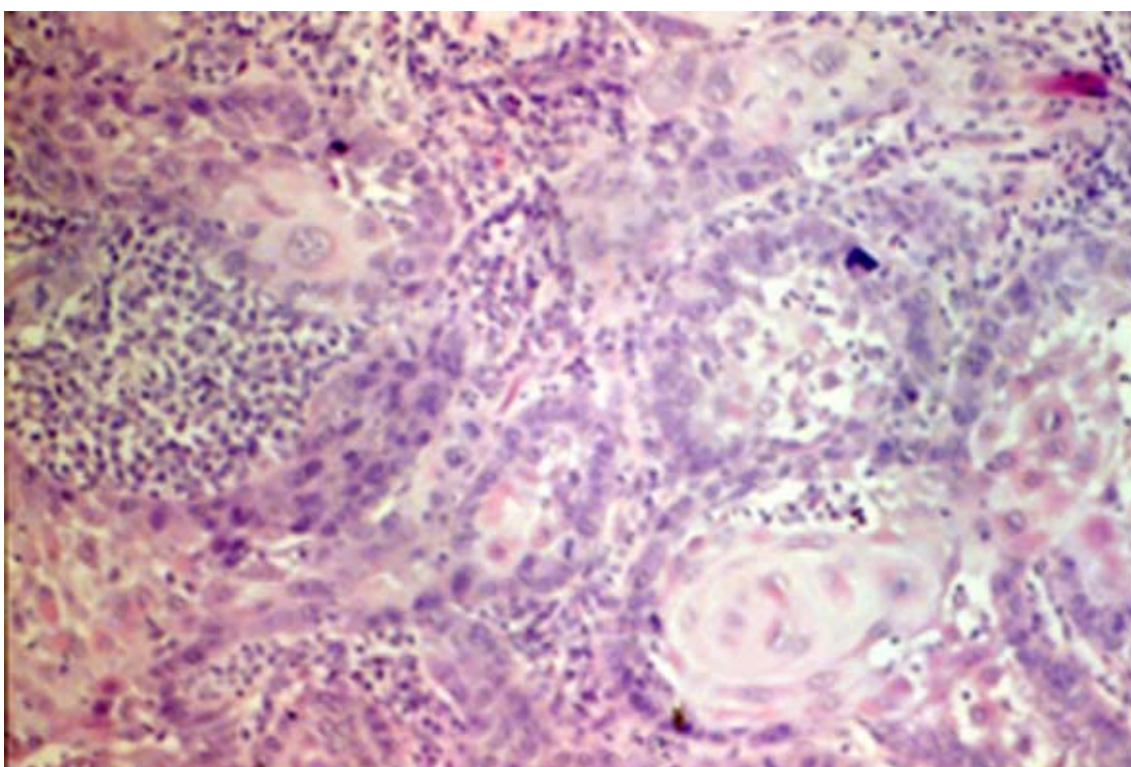


Figura 5.2 – Carcinoma epidermóide de baixo grau de malignidade. Observar Intenso infiltrado inflamatório, formação de pérolas córneas e queratinizações individuais

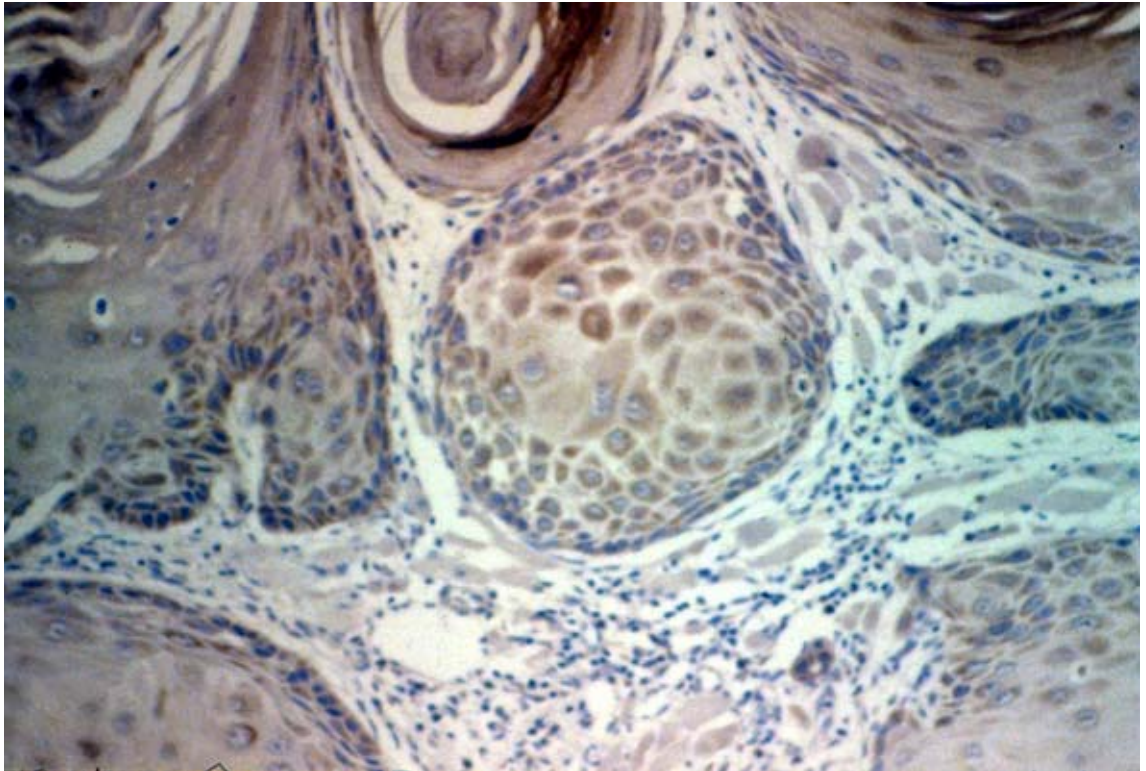


Figura 5.3 – Expressão da ciclina D1. Notar marcação tanto na periferia quanto na porção central das ilhas de células epiteliais

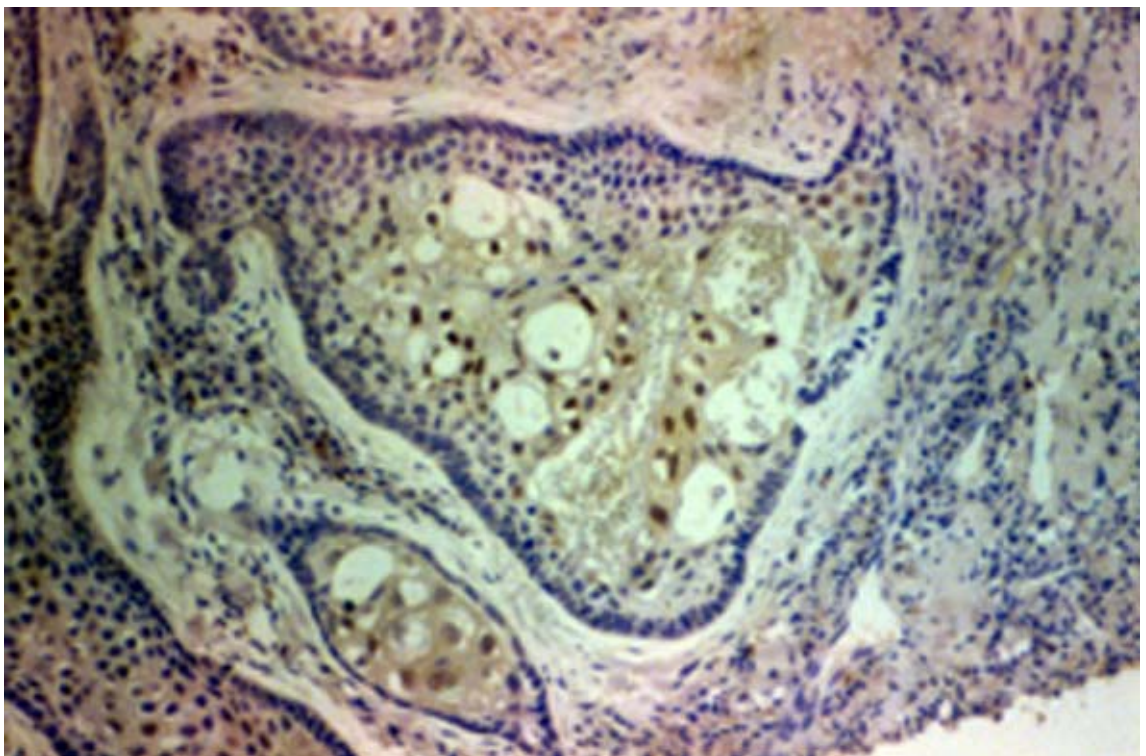


Figura 5.4 – Expressão da c-jun. Notar marcação nas células da região central

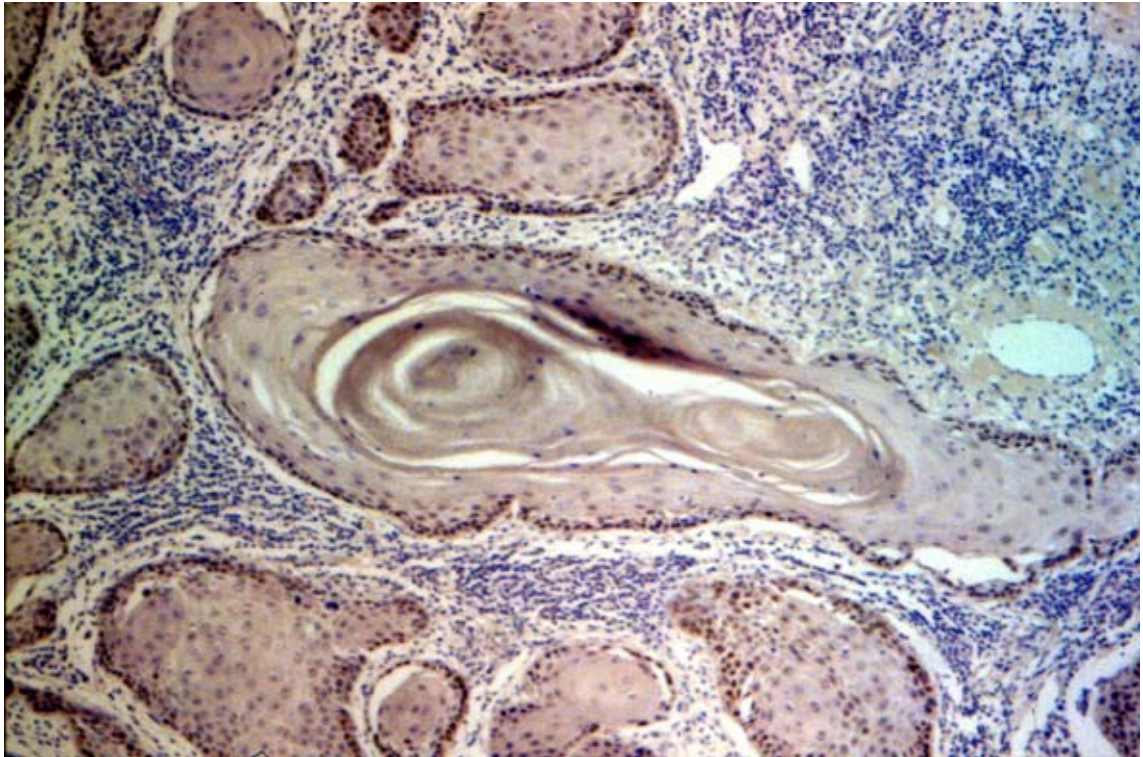


Figura 5.5 – Expressão da proteína do retinoblastoma. Marcação intensa em células de lesão de baixo grau de malignidade nas regiões periféricas

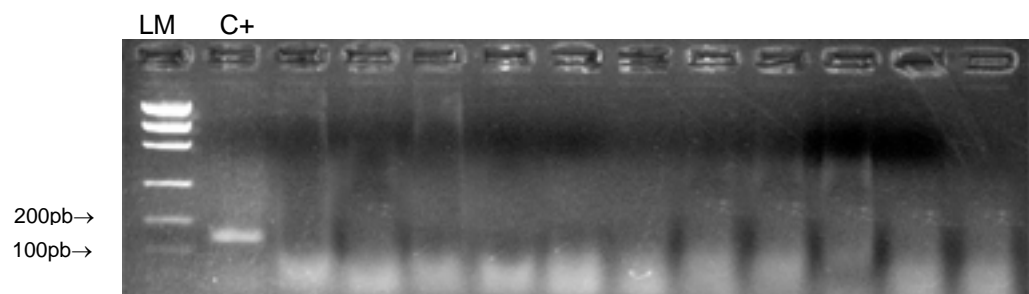


Figura 5.6 – PCR do HPV. Aqui mostrando 11 dos 63 casos. Apenas o controle (c+) positivo amplificou

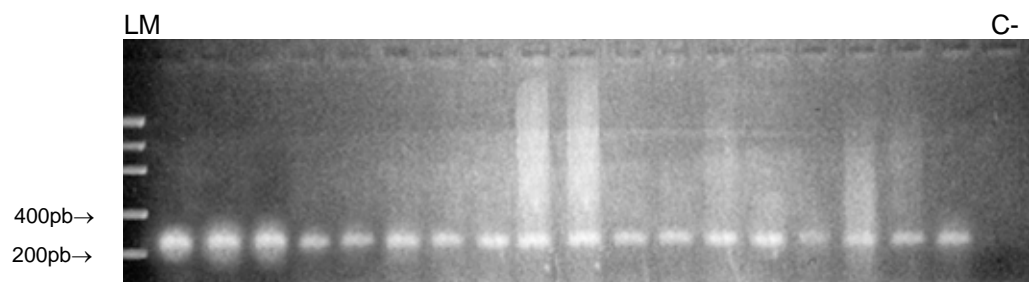


Figura 5.7 – PCR do gene constitutivo D2S119. Aqui mostrando 18 dos 63 casos. Todos os casos amplificaram para o gene constitutivo

6 DISCUSSÃO

O tema deste estudo foi escolhido na tentativa de entender parte do comportamento biológico do carcinoma epidermóide bucal. Neste estudo, observou-se que a expressão das proteínas analisadas – ciclina D1, c-jun e pRb – seguiu o padrão de expressão detectado em outros trabalhos publicados e que o HPV parece não estar envolvido na carcinogênese do carcinoma epidermóide bucal de todas as populações estudadas, assim como muitos trabalhos no mundo também demonstram.

Neste trabalho, seis (9,5%) dos 63 casos estudados exibiram expressão de ciclina D1 em menos de 1% das células. Nos outros 57 (90,5%), a expressão foi igual ou superior a 1%. Esses dados são semelhantes aos de Neves (2000), que encontrou positividade para a ciclina D1 em 24 dos 28 casos estudados, o que representa um percentual de 85,71%. Porém, nesses dois trabalhos, a porcentagem de positividade da ciclina D1 foi relativamente superior ao que normalmente se encontra na literatura. Outro dado que coincide é que dois dos seis casos negativos neste trabalho foram classificados em alto grau de malignidade, assim como no estudo de Neves (2000), no qual um dos quatro casos negativos foi classificado de alto grau de malignidade. Nesse mesmo estudo, Neves comparou a expressão da ciclina D1 com o grau histológico de malignidade e, apesar de não encontrar diferença estatisticamente significativa, houve uma marcação média de 19,3% de células para os carcinomas de baixo grau de malignidade e 26,03% nos casos de alto grau de malignidade. O resultado foi discretamente diferente do encontrado no presente estudo. Apesar de também não haver diferença estatística, a marcação

média nos casos de baixo grau de malignidade foi de 26% e nos de alto grau de malignidade de 22,2%.

Alguns trabalhos comparam o comportamento biológico dos carcinomas com a expressão da ciclina D1. Porém, muitos autores consideram superexpressão apenas quando um percentual maior dessa proteína é encontrado nos casos estudados. Masuda et al. (1996) encontraram em 23 (54,8%) casos de carcinoma primário de laringe, de um total de 42 estudados, uma marcação em mais de 20% das células. Esse percentual é extremamente semelhante ao detectado neste trabalho, em que 33 (52,4%) dos 63 casos analisados tiveram a marcação da ciclina D1 maior que 20%. Eles notaram que nos casos em que a ciclina D1 estava superexpressa houve um maior número de metástase regional. Além disso, o prognóstico para esses pacientes foi pior.

Já Mineta et al. (2000) estudaram 94 casos de carcinoma epidermóide de língua e dividiram a marcação da ciclina D1 em alta intensidade e baixa intensidade. Foram considerados de alta intensidade os casos que tiveram mais de 50% das células marcadas. Assim, houve 18 (19%) casos com superexpressão, ou seja, mais de 50% das células marcadas. Esse dado também é convergente com os encontrados neste trabalho, pois sete lesões estudadas exibiram marcação superior a 50%, o que representa um percentual de 11,1%. É interessante destacar que no estudo feito por Mineta et al. (2000) a sobrevida de cinco anos foi de 39% nos casos com superexpressão da ciclina D1 e de 62% naqueles considerados de baixa expressão. Porém, os autores atentaram para a dificuldade de avaliar a superexpressão devido à variação de intensidade que ocorre consideravelmente pela sensibilidade da técnica utilizada. Neste estudo, também foi considerada apenas a presença da proteína, e não a intensidade da marcação, o que parece ser

suficiente quando se analisa a ciclina D1 para verificar o comportamento biológico dos carcinomas epidermóides bucais.

Vicente et al. (2002) igualmente avaliaram a capacidade da ciclina D1 como marcador biológico e indicador de prognóstico. Esses autores trabalharam com 35 casos de carcinoma epidermóide bucal primário. No período em que eles acompanharam os pacientes, 14 (40%) morreram de recorrência da doença e 20 (57%) continuaram vivos e não apresentaram recidiva. Com um (3%) paciente os autores perderam o contato. Eles usaram a mesma metodologia de Mineta et al. (2000) e consideraram tumores com superexpressão aqueles que tinham marcação em mais de 50% das células, e com baixa expressão os que exibiram menos de 50% das células positivas. Quatro casos foram negativos, o que significa um percentual de aproximadamente 12%. O dado é compatível ao encontrado em 9,5% dos 63 casos estudados na presente pesquisa. Dos outros 31 casos do estudo de Vicente et al. 25 (71,4%) houve menos de 50% das células marcadas e seis (17,1%) exibiram superexpressão, com mais de 50% das células marcadas. No trabalho, eles contaram os núcleos marcados de um total de 200 células. Os campos para a contagem foram escolhidos consecutivamente. Neste estudo, apesar de terem sido contadas 500 células e escolhidos campos aleatórios, essa diferença metodológica parece não provocar outros resultados, que foram significativamente semelhantes. Se comparados esses resultados com os de Neves (2000), que fez a contagem de 1.000 células, nota-se que também são parecidos.

Vicente et al. (2002) detectaram, ainda, que a expressão da ciclina D1 não teve relação, estatisticamente significativa, com o uso de bebida alcoólica, fumo, idade do paciente, tamanho do tumor e, como neste trabalho, com a gradação histológica de malignidade. Dos seis pacientes que exibiram superexpressão da

ciclina D1, três (50%) sobreviveram, enquanto dos 29 que exibiram baixa expressão dessa proteína sobreviveram 18 (62%). Os autores também notaram, como Masuda et al. (1996) e Rodolico et al. (2005), que há correlação entre a expressão da ciclina D1 e a presença de metástases em linfonodos regionais.

Em relação à expressão da proteína c-jun, este trabalho mostrou que em sete (11,1%) casos, dos 63 estudados, a marcação foi inferior a 1%. Nos outros 56 (88,9%), a marcação foi igual ou superior a 1%. Esses dados são análogos aos verificados por Turatti et al. (2005), que encontraram mais de 1% das células marcadas em 21 (87,5%) dos 24 casos analisados. Porém, diferentemente do que foi feito neste trabalho, eles não compararam a expressão dessa proteína com a gradação histológica do carcinoma epidermóide bucal, e sim com lesões de variados graus de atipia. Meggiato et al. (2003) também encontraram resultados paralelos ao deste estudo: 20 (87%) dos 23 casos de câncer pancreático por eles analisados exibiram expressão dessa proteína.

Já Yokoyama et al. (1998) avaliaram a expressão da proteína c-jun em carcinomas endometriais e consideraram superexpressão as lesões com mais de 30% das células positivas para a c-jun. Em 28 (44,4%) dos 63 casos por eles estudados, a proteína estava superexpressa. Esses dados são convergentes com os deste trabalho, no qual se verificaram mais de 30% das células marcadas em 32 (50,7%) dos 63 casos analisados.

Sousa et al. (2002) estudaram a expressão da proteína c-jun em 20 casos de carcinoma epidermóide bucal comparando com a expressão no epitélio de mucosa bucal normal. Os carcinomas foram divididos, de acordo com o grau de diferenciação, em três grupos: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e indiferenciado. Na mucosa normal, a proteína estava expressa no citoplasma das

células de todas as camadas suprabasais. A camada basal não exibiu expressão dessa proteína. Nos carcinomas, a c-jun foi expressa mais fortemente nos bem diferenciados. Nos moderadamente diferenciados, a expressão foi menor e totalmente ausente nas quatro lesões indiferenciadas.

Esses dados são semelhantes ao deste trabalho – das sete lesões que exibiram marcação em menos de 1% para essa proteína, seis foram classificadas em alto grau de malignidade e, como pode ser visto na Tabela 4.5, que mostra o sistema de gradação histológica, essas lesões são, geralmente, mais indiferenciadas. Das lesões estudadas nesta pesquisa, a marcação foi mais intensa nas áreas de pérolas córneas, o que é compatível com o resultado de Sousa et al. (2002), no qual as lesões bem diferenciadas exibiram marcação mais forte.

Ainda Karamouzis et al. (2004) estudaram, na laringe, lesões com variados graus de atipia e carcinoma epidermóide. Os 100 pacientes com câncer analisados por eles foram divididos em: 45 tumores bem diferenciados, 43 moderadamente diferenciados e 12 indiferenciados, como Sousa et al. (2002). Os autores consideraram positivos os tumores com mais de 5% das células marcadas. Entretanto, eles avaliaram a intensidade da marcação da proteína nos carcinomas considerados positivos. Os autores não encontraram diferenças estatísticas da expressão da proteína entre os grupos de carcinomas estudados.

Porém, de maneira geral, das 100 lesões analisadas, 12 foram avaliadas como negativas quatro classificadas como lesões bem diferenciadas, seis moderadamente diferenciadas e duas indiferenciadas. Esse percentual de lesões negativas, que, no trabalho de Karamouzis et al. (2004), foi de 12%, é bem próximo ao encontrado neste estudo: 11,1%. Contudo, foram consideradas negativas neste estudo as lesões com menos de 1% das células marcadas. Avaliando-se

separadamente os grupos, o percentual de lesões negativas, em relação a cada grupo, aumenta de acordo com a indiferenciação – no grupo de lesões bem diferenciadas é de 9%; no grupo de lesões moderadamente diferenciadas é de 14%; e no grupo de lesões indiferenciadas é de 17%. Esses dados são semelhantes aos de Sousa et al. (2002), que, apesar de terem avaliado a quantidade de células marcadas – e não a intensidade –, verificaram maior expressão da c-jun nos tumores mais diferenciados.

Neste estudo, embora não tenha sido encontrada diferença estatística entre os tumores de alto e baixo grau de malignidade, o número de células que expressaram a proteína c-jun foi maior nos casos de baixo grau de malignidade, sendo que ordinariamente esses tumores são mais diferenciados.

A proteína do retinoblastoma foi a única, estudada neste trabalho, que mostrou diferença estatística entre os dois grupos ($p < 0.05$ teste t de Student). Entretanto, como ocorreu com as outras duas proteínas analisadas, a proteína do retinoblastoma estava expressa em um número maior de células no grupo das lesões de baixo grau de malignidade. Este trabalho também mostrou que, das 63 lesões analisadas, 10 (15,5%) apresentaram marcação de menos de 1% das células. Apenas um caso foi classificado de baixo grau de malignidade e nove de alto grau de malignidade. Tal resultado coincide com o de Ceccarelli et al. (1998), que, em carcinomas de mama, observaram que a maioria dos tumores indiferenciados ou com diferenciação moderada – com maior capacidade proliferativa – foi negativa para essa proteína. Ambrosch et al. (2001) também encontraram dados semelhantes ao deste trabalho, pois em 57 carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço estudados o percentual de lesões negativas para a expressão da proteína do retinoblastoma foi de 11% (6) dos casos.

Este estudo também encontrou dados semelhantes aos de Ikeguchi et al. (2000). Eles avaliaram em 191 casos a expressão da proteína do retinoblastoma em carcinoma primário de esôfago. Os autores consideraram positivos os tumores que exibiram mais de 50% das células marcadas e encontraram um percentual de 57% (109) dos casos positivos. No presente trabalho, o percentual encontrado para lesões com mais de 50% das células positivas para proteína do retinoblastoma foi de 22,5% (14) dos casos. Ikeguchi et al. (2000) ainda notaram que os tumores mais agressivos e com metástase, geralmente, foram negativos para essa proteína. Também neste estudo as lesões mais agressivas exibiram menor expressão dessa proteína e a maioria dos casos negativos para essa proteína no presente trabalho era de lesões de alto grau de malignidade. Ikeguchi et al. (2000) constataram ainda que a sobrevida nos casos negativos foi menor em comparação com os tumores positivos para a proteína do retinoblastoma. Pavelic et al. (1996), estudando carcinomas epidermóides bucais, notaram que a perda de expressão do pRb em estágio inicial é um indicador de prognóstico importante. Eles observaram que tumores maiores e mais agressivos geralmente não expressavam a pRb.

Nakahara et al. (2000) também observaram que a expressão dessa proteína diminui de acordo com a transformação maligna das lesões. Eles notaram que na mucosa normal ela sempre está expressa. Em leucoplasias, os autores encontraram um percentual de 87% das lesões marcadas e, em carcinomas, de 43%. Esses autores acreditam que alterações na via do retinoblastoma são eventos freqüentes e precoces na carcinogênese do carcinoma epidermóide bucal.

Koontongkaew et al. (2000) não encontraram expressão da proteína do retinoblastoma em 39 (74%) das 53 lesões estudadas. Apesar desse resultado ser superior ao encontrado no presente estudo, vale ressaltar que a expressão dessa

proteína foi maior nos casos menos agressivos. Porém, em apenas sete (13%) casos eles encontraram mais de 50% das células marcadas. Neste trabalho, o número de tumores que marcaram mais de 50% das células foi 14 (22,2%), o que mostra a semelhança nos resultados obtidos. Koontongkaew et al. (2000) consideraram alto o número de lesões negativas à expressão dessa proteína. Eles acreditam que isso ocorre devido à inativação do gene retinoblastoma.

Relacionando as proteínas estudadas, quando comparadas a média encontrada, nos dois grupos de carcinoma epidermóide bucal analisados, a expressão de cada proteína foi sempre menor nos casos de alto grau de malignidade. Assim, pode haver uma relação diretamente proporcional na expressão dessas três proteínas. Os dados são convergentes com a afirmação de que o gene da ciclina D1 é um dos alvos do fator de transcrição AP-1 (Hennigan; Stambrook, 2001). Ainda, esses dados confirmam que o gene da proteína do retinoblastoma é regulado pela ciclina D1, pois a ciclina D1 forma complexos com a CDK4 e com a CDK6. A função principal desses complexos é fosforilar a proteína retinoblastoma. A sua fosforilação leva a célula à progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular (CHEN et al., 1999; GOODER et al., 1997).

A participação do HPV como um dos fatores etiológicos do câncer de boca é relativamente controversa. Estudos mostram que a prevalência desse vírus pode variar de 0% a 100%, o que comprova que ele pode tanto não ter nenhuma participação na etiologia dessa doença como ser um importante fator etiológico. Porém, essa condição parece ter ligação com a população estudada. No presente estudo, nenhum dos 63 casos analisados mostrou amplificação do DNA do HPV. Rivero e Nunes (2006) encontraram o mesmo resultado, o que reforça que os fatores etiológicos dessa doença variam de acordo com a população estudada. Os

autores analisaram 40 casos de carcinoma epidermóide bucal. Desse total, o DNA de 17 casos foi obtido de tecido congelado, condição que conserva melhor o material genético. Eles também utilizaram os primers GP5+ e GP6+, que amplificam parte da região L1 do vírus.

Ha et al. (2002) encontraram o DNA do HPV em apenas um de 34 casos de carcinoma epidermóide bucal – índice muito baixo, semelhante ao encontrado neste trabalho. Os autores usaram uma técnica extremamente sensível – PCR Quantitativo em Tempo Real (Real Time Quantitative PCR) – que permite saber quantas cópias de DNA foram feitas.

Esses valores coincidem com os valores encontrados por Dahlgren et al. (2004). De 85 lesões localizadas na parte móvel da língua, esses autores encontraram o HPV em apenas dois, o que representa um percentual de 2,4%, muito próximo dos resultados deste trabalho. Em contrapartida, os tumores na base da língua apresentaram freqüência de 40%, pois 10 das 25 lesões exibiram amplificação do DNA de HPV. Os primers utilizados foram o GP5+ e o GP6+, e o DNA dos casos foi extraído de material que estava armazenado em parafina. Esses autores sugerem que essa condição seja específica de lesões localizadas em boca, pois se sabe que o HPV, principalmente os subtipos 16 e 18, são os principais agentes etiológicos dos carcinomas cervicais e anogenitais. Ainda de acordo com os autores, deve ser aventada a possibilidade de o HPV 16 – o subtipo mais carcinogênico dos HPVs e o mais verificado em tumores malignos – ser encontrado primariamente em câncer originário de locais com atividade inflamatória, como os na região cervical, em tonsilas e na base da língua. Os autores especulam ainda que células infectadas pelo HPV nas proximidades de células imunologicamente competentes, capazes de responder a vários antígenos externos, incluindo fatores

de crescimento, podem ser estimuladas a dividir-se, o que facilita o desenvolvimento de tumores.

No Brasil, alguns estudos mostram que a incidência do HPV em carcinoma epidermóide bucal é baixa ou inexistente. Miguel et al. (1998) estudaram 45 casos de carcinomas de cabeça e pescoço, dos quais um era em seio maxilar, dois na gengiva, dois na mucosa jugal, três no assoalho bucal, três na região retromolar, cinco na base da língua, seis na parte móvel da língua, seis em tonsilas, sete na laringe e 10 em seio piriforme. Todos esses casos estavam congelados a 70° negativos, que conserva melhor o material genético. Os pesquisadores usaram os primers MY9 e MY11, que, como os primers usados neste trabalho, flanqueiam parte da região L1 do vírus. O DNA do HPV foi encontrado em apenas cinco casos: três deles localizados em tonsilas, um na base da língua e um em seio piriforme. Lazzari et al. (2004), em um trabalho em condições parecidas, mas envolvendo outras lesões além do carcinoma epidermóide bucal, encontraram incidência de apenas 11,3% em um total de 80 casos estudados. Porém, nos casos de carcinoma nenhum amplificou o DNA de HPV.

Esses dados são semelhantes aos de Dahlgren et al. (2004) e aos do trabalho desenvolvido nesta pesquisa. Na cavidade bucal, não foi encontrado material genético do HPV em nenhum caso de carcinoma epidermóide bucal estudado neste trabalho.

Porém, a exemplo do que ocorre em outros sítios corporais, como os anteriormente citados, muitos trabalhos mostram que o HPV também é um importante causador do carcinoma epidermóide bucal. Zhang et al. (2004) mostram em seu trabalho que 74% (54/73) das lesões de carcinoma epidermóide bucal apresentaram positividade para HPV, sendo 36 somente para HPV-16, 11 somente

para HPV-18 e sete positivas tanto para HPV-16 como para HPV-18. Essa discrepância de resultados talvez possa ser justificada pela escolha do material selecionado e sua manipulação, além da sensibilidade e da especificidade da técnica aplicada. Apesar de, nos casos deste trabalho, o DNA ter exibido amplificação perfeita para o gene constitutivo que foi usado, pode ter havido falha na obtenção do DNA do HPV, devido a pequena quantidade de material genético deste vírus, que geralmente se encontra, no interior da célula.

7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, é possível concluir que:

- 7.1 A expressão da ciclina D1 e da c-jun independe da gradação histológica de malignidade nos casos de carcinoma epidermóide bucal.
- 7.2 Lesões mais agressivas expressam menos a proteína do retinoblastoma.
- 7.3 A não-amplificação do DNA do HPV sugere que esse vírus não participou do processo de carcinogênese nos casos de carcinoma epidermóide bucal analisados.

REFERÊNCIAS¹

Adams PD, Kaelin Jr WG. Negative control elements of the cell cycle in human tumors. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10(6):791-7.

Akervall JA, Michalides RJ, Mineta H, Balm A, Borg A, Dictor MR, et al. Application of Cyclin D1 in squamous cell carcinoma of the Head and neck and the prognostic value of chromosomal abnormalities and cyclin D1 overexpression. *Cancer* 1997;28(15):380-9.

Akin H, Yilmazbayhan D, Kilicaslan Z, Dilege S, Dogan O, Toker A, et al. Clinical significance of P16INK4A and retinoblastoma proteins in non-small-cell lung carcinoma. *Lung Cancer* 2002;38(3):253-60.

Ambrosch P, Schlott T, Hilmes D, Ruschenburg I. p16 alterations and retinoblastoma protein expression in squamous cell carcinoma and neighboring dysplasia from the upper aerodigestive tract. *Virchows Arch* 2001;438(4):343-9.

Angel P, Karin M. The role of jun, fos and the AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;1072:129-57.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987;95(3):229-249.

Araújo-Filho VJ, De Carlucci D, Sasaki SU, Montag E, Azato Cordeiro AC, Ferraz AR. Incidence of oral cancer profile at a general hospital in São Paulo. *Rev Hosp Clín Fac Med São Paulo*. 1998;53:110-113.

Azzimonti B, Hertel L, Aluffi P, Pia F, Monga G, Zocchi M, et al. Demonstration of multiple HPV types in laryngeal premalignant lesions using polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Med Virol* 1999;59:110-6.

Bianchi AB, Fischer SM, Robles AI, Rinchik EM, Conti CJ. Overexpression of cyclin D1 in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 1993;8(5):1127-33.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo Bases de Dados MEDLINE.

Bradford CR, Zacks SE, Androphy EJ, Gregoire L, Lancaster WD, Carey TE. Human papillomavirus DNA sequences in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinomas. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;104(3):303-10.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Disponível em:
URL:<http://www.inca.gov.br>. 2006.

Casiglia J, Woo S-B. A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent* 2001;49(1):72-82.

Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Taffurelli M, Gamberini M, Pileri SA, et al. Retinoblastoma (RB1) gene product expression in breast carcinoma. Correlation with Ki-67 growth fraction and biopathological profile. *J Clin Pathol* 1998;51(11):818-24.

Chen PL, Scully JY, Wang JY, Lee WH. Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation. *Cell* 1989;58(6):1193-8.

Chen QM, Luo G, Li BQ, Samaranayake LP. Expression of p16 and CDK4 in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinoma: a semi-quantitative immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 1999;28(4):158-64.

Chen SL, Mounts P. Transforming activity of E5a protein of human papillomavirus type 6 in NIH3T3 and C137 cells. *J Virol* 1990;64:3226-33.

Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-Fos protein interacts with c-jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 1988;12;54(4):541-52.

Chow LT, Broker TR. Papillomavirus DNA replication. *Intervirology* 1994;37:143-9.

Claudio PP, Tonini T, Giordano A. The retinoblastoma family: twins or distant cousins? *Genome Biol* 2002;3(9):3012.1-3012.9

Cobrinik D, Dowdy SF, Hinds PW, Mitnacht S, Weinberg RA: The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *Trend Biochem Sci* 1992;17:312-5.

Crook T, Tidy JA, Vousden KH. Degradation of TP53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for TP53 binding and trans-activation. *Cell* 1991;67:547–56.

Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32B(1):55–62.

Curran T, Franza BR Jr. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 1988;55(3):395-7.

Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, Hogmo A, Bjornestal L, Lindholm J, et al. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer* 2004;112(6):1015-9.

De Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PRC. *J Gen Virol* 1995;76(Pt4):1057-62.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 1991;352:824–7.

Elamin F, Steingrimsdottir H, Wanakulasuriya S, Johnson N, Tavassoli M. Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in U.K. subjects: a novel method of detection. *Oral Oncol* 1998;34(3):191-7.

Ferrara C, Tessari G, Poletti A, Giacon C, Meggiato T, Martines D, et al. Ki-67 and c-jun expression in pancreatic cancer: a prognostic marker? *Oncol Rep* 1999;6(5):1117-22.

Ferlay J, Pizzani P, Parkin DM. *Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Version 1*, Lyon: IARC Press; 2001.

Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Munoz N: Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: Etiological clues. *Oral Oncol* 2000;36:106–15.

Goeder NM, Gannon J, Hunt T, Morgan PR. Cell cycle regulation proteins – an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncol* 1997;33(2):61-73.

Ha PK, Pai SI, Westra WH, Gillison ML, Tong BC, Sidransky D, et al. Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res* 2002;8(5):1203-9.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmark of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.

Hennigan RF, Stambrook PJ. Dominant negative c-jun inhibits activation of the cyclin D1 and cyclin E kinase complex. *Mol Biol Cell* 2001;12:2352-63.

Hoffmann M, Gorogh T, Gottschlich S, Lohrey C, Rittgen W, Ambrosch P, et al. Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients. *Cancer Lett* 2005;218(2):199-206.

Hubbert NL, Sedman SA, Schiller JT. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of TP53 in human keratinocytes. *J Virol* 1992;66:6237-41.

Ikeguchi M, Oka S, Gomyo Y, Tsujitani S, Maeta M, Kaibara N. Combined analysis of p53 and retinoblastoma protein expressions in esophageal cancer. *Ann Thorac Surg* 2000;70(3):913-7.

Johnson NW. A global view of the epidemiology of oral cancer. In: Johnson MW, editor. *Oral Cancer*. Cambridge: Cambridge University Press; 1991. v. 2, p. 3-26.

Karamouzis MV, Sotiropoulou-Bonikou G, Vadoros G, Varakis I, Papavassiliou AG. Differential expression of retinoic acid receptor beta (RARbeta) and the AP-1 transcription factor in normal, premalignant and malignant human laryngeal tissues. *Eur J Cancer* 2004;40(5):761-73.

Kirnbauer R, Taube J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. *J Virol* 1993;67:6923-36.

Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996;380:79-82.

Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, Leelakriangsak M, Amornphimoltham P. Alterations of p53, pRb, cyclin D(1) and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2000;36(4):334-9.

Kovary K, Bravo R. The jun and fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1991;11(9):4466-72.

Kowalski LP, Carvalho AL. Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. *Oral Oncol* 2001;37:94-8.

Kuo MYP, Lin CY, Hahn I, Cheng SJ, Chiang CP. Expression of cyclin D1 is correlated with poor prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1999;28(4):165-9.

Lazzari CM, Krug LP, Quadros OF, Baldi CB, Bozzetti MC. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 2004;33(5):260-3.

Lingfei K, Pingzhang Y, Zhengguo L, Jianhua G, Yaowu Z. A study on p16, pRb, cdk4 and cyclinD1 expression in non-small cell lung cancers. *Cancer Lett* 1998;14,130(1-2):93-101.

Loeb AI. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 2001;61:3230-9.

Lo Muzio L, Mignogna MD, Staibano S, de Vico G, Salvatore G, Damiano S, et al. Morphometric study of nucleolar organiser regions (AgNOR) in HPV-associated precancerous lesions and microinvasive carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol* 1997;33(4):247-59.

Masuda M, Hirakawa N, Nakashima T, Kuratomi Y, Komiyama S. Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. *Cancer* 1996;178(3):390-5.

Mate JL, Ariza A, Aracil C, Lopez D, Isama M, Peres-Piteira J, et al. Cyclin D1 overexpression in non-small cell lung carcinoma: correlation with Ki67 labelling index and poor cytoplasmic differentiation. *J Pathol* 1996;180(4):395-9.

McBride AA, Romanczuk H, Howley PM: The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem* 1991;266:18411-4.

McKaig RG, Baric RS, Olshan A. Human papillomavirus and head and neck cancers: Epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 1998;20:250–65.

Meggiato T, Calabrese F, De Cesare CM, Baliello E, Valente M, Del Favero G. C-JUN and CPP32 (CASPASE 3) in human pancreatic cancer: relation to cell proliferation and death. *Pancreas* 2003;26(1):65-70.

Merkelbach-Bruse S, Jakob C, Tiete L, Schröder W, Rath W, Füzesi L. Consensus polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay for human papillomavirus detection and typing in cervical specimens. *Diag Mol Pathol* 1999;52(8):555-8.

Miyamoto R, Uzawa N, Nagaoka S, Hirata Y, Amagasa T. Prognostic significance of cyclin D1 amplification and overexpression in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2003;39(6):610-8.

Michalides RJ, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A. Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1995;55(5):975-8.

Michalides RJ, van Veelen N, Kristel PMP, Hart AAM, Loftus BM, Hilgers FJM, et al. Overexpression of cyclin D1 indicates poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123(5):497-502.

Miguel RE, Villa LL, Cordeiro AC, Prado JC, Sobrinho JS, Kowalski LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *Am J Surg* 1998;176(5):428-9.

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 2001;91(6):622-35.

Million RR, Cassisi NJ, Mancuso AA. Oral cavity. In: Millon RR, Cassisi NJ, editors. *Management of head and neck cancer*. 2nd ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1994. cap. 16. p. 321-39.

Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Ueda Y, Misawa K, Harada H, et al. Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2000;36(2):194-8.

Motokura T, Arnold A. Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3(1):5-10.

Munger K, Phelps WC, Bubbo V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol* 1989;63:4417-21.

Murray AW, Kirchner MW. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 1989;339(6222):275-80.

Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T. Alterations of Rb, p16INK4A and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2000;160(1):3-8.

Neves AC. Análise comparativa da expressão imuno-histoquímica da ciclina D1 com a do P21 e da expressão imuno-histoquímica de ambos com a gradação histológica de malignidade de carcinomas epidermóides de boca [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2000.

Neves AC, Rivero ERC, Silva-Valenzuela, Sousa SCOM, Nunes FD. Método de extração de DNA de material de arquivo pelo acetato de amônio e pelo isopropanol [resumo Pb329]. *Pesqui Odontol Bras* 2002;16:210.

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

Pavelic ZP, Lasmar M, Pavelic L, Sorensen C, Stambrook PJ, Zimmermann N, et al. Absence of retinoblastoma gene product in human primary oral cavity carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996;32B(5):347-51.

Petti L, Dimaio D: Specific interaction between the bovine papillomavirus E5 transforming protein and the beta receptor for platelet-derived growth factor in stable transformed and acutely transformed cells. *J Virol* 1994;68:3582-92.

Pinto Jr DS. Critérios de avaliação do prognóstico – tipo histológico, marcadores imuno-istoquímico – em biópsias de carcinomas epidermóides de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia USP; 1991.

Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer* 1993;55:891-903.

Poljak M, Seme K, Gale N. Detection of human papillomaviruses in tissue specimens. *Adv Anatomic Pathol* 1998;5(4):216-34.

Rivero ER, Nunes FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. *Pesqui Odontol Bras* 2006;20(1):21-4.

Rodolico V, Aragona F, Cabibi D, Di Bernardo C, Di Lorenzo R, Gebbia N, et al. Overexpression of cyclin D1 and interaction between p27Kip1 and tumour thickness predict lymph node metastases occurrence in lower lip squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005;41(3):268-75.

Ryseck RP, Hirai SI, Yaniv M, Bravo R. Transcriptional activation of c-jun during the G0/G1 transition in mouse fibroblasts. *Nature* 1988;11;334(6182):535-7.

Roberts S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW, Gallimore PH: Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* 1993;197:176–87.

Sassone-Corsi P, Ransone LJ, Lamph WW, Verma IM. Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature* 1988;336(6200):692-5

Scheffner M, Romanczuk H, Munger K, Huibregtse JM, Meitz JA, Howley PM: Functions of human papillomavirus proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994;186:83–99.

Shin KY, Kong G, Kim WS, Lee TY, Woo YN, Lee JD. Overexpression of cyclin D1 correlates with early recurrence in superficial bladder cancers. *Br J Cancer* 1997;75(12):1788-92.

Sousa SO, Mesquita RA, Pinto DS Jr, Gutkind S. Immunolocalization of c-Fos and c-jun in human oral mucosa and in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2002;31(2):78-81.

Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983;12(6):418-24.

Szentirmay Z, Polus K, Tamas L, Szentkuti G, Kurcsics J, Csernak E, et al. Human papillomavirus in head and neck cancer: molecular biology and clinicopathological correlations. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24(1):19-34.

Todd R, Donoff RB, Wong DT. The molecular biology of oral carcinogenesis: Toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55(6):613-23; discussion 623-5.

Turatti E, da Costa Neves A, de Magalhaes MH, de Sousa SO. Assessment of c-jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Sci* 2005;47(2):71-6.

Vicente JC, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, Lopez-Arranz JS. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol* 2002;38(3):301-8.

Volm M, Drings P, Wodrich W. Prognostic significance of the expression of c-fos, c-jun and c-erbB-1 oncogene products in human squamous cell lung carcinomas. *J Cancer Res Oncol* 1993;119(9):507-10.

Volm M, Drings P, Wodrich W, van Kaick G. Expression of oncoproteins in primary human non-small cell lung cancer and incidence of metastases. *Clin Exp Metastasis* 1993;11(4):325-9.

Vousden K, Lu X. Live or let die: The cell's response to p53. *Nature Rev Cancer* 2002;2: 594–604.


Yokoyama Y, Sagara M, Sato S, Saito Y. Value of glutathione S-transferase pi and the oncogene products c-jun, c-Fos, c-H-Ras, and c-Myc as a prognostic indicator in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol* 1998;68(3):280-7.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with TP53. *Science* 1990;248:76–9.

Zhang Z-y, Sdek O, Cao J, Chen W-T. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac* 2004;33:71-4.

Zur Hausen H. Papillomavirus causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. Review. *J Nat Cancer Inst* 2000;92:690-9.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



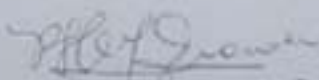
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 162/04

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa *"Detecção do Papiloma Vírus Humano (HPV) em Carcinoma Epidermóide de boca e leucoplasias utilizando-se hibridização in situ e PCR. Relação com a expressão da ciclina D1, fator de transcrição C-Jun e com a proteína do retinoblastoma"*, de responsabilidade do Pesquisador **Arlindo Tadeu Teixeira Aburad**, sob orientação da Profa. Dra. **Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa**.

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

São Paulo, 05 de outubro de 2004


Profª Drª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" CEP 05508-900
São Paulo - SP - Diretoria Telefax: (011) 3091-0062/3091-7817/3091-7860 - Compras (011) 3091-7895
Impressão em S.B.O.