

**ARTHUR RODRIGUEZ GONZALEZ CORTES**

**COMPARAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS EXPRESSÕES DAS  
PROTEÍNAS P27 E C-JUN NA CARCINOGENESE INTRA-ORAL**

São Paulo  
2009

**Arthur Rodriguez Gonzalez Cortes**

**Comparação imunoistoquímica das expressões das proteínas p27 e c-jun na carcinogênese intra-oral**

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa. Dra. Suzana C. O. M. Sousa

São Paulo  
2009

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Cortes ARG. Comparação imunoistoquímica das expressões das proteínas p27 e c-jun na carcinogênese intra-oral [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

São Paulo, / /2009

### 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: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

À minha esposa, Juliana, por sua dedicação, carinho, companheirismo, amor e bom humor inesgotável.

Aos meus pais, Maria Del Carmen e Djalma, por todo o incentivo, carinho e apoio concedido.

Ao meu irmão, Thomaz, por toda a força e energia compartilhada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** por me direcionar e me dar coragem e energia para percorrer os caminhos da minha vida.

Agradeço à **minha família**, incluindo aqui também a **família de minha esposa**, por todo o apoio e estrutura fornecida, que me permitiu crescer e amadurecer da maneira mais saudável possível.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. **Suzana C.O.M. de Sousa**, por permitir a realização desse trabalho, por ter me acolhido e me orientado de forma brilhante, sempre me fornecendo apoio acadêmico e moral, por todos os conhecimentos transmitidos e por toda a ajuda concedida em todos os momentos que eu precisei. Muito obrigado por tudo.

Agradeço à Profa. Dra. **Marina H.C.G. Magalhães**, por toda a sua ajuda e contribuição durante o curso, por ter se mostrado sempre disponível para me ajudar.

Agradeço ao Prof. Dr. **Décio dos Santos Pinto Júnior**, por todos os momentos divertidos, regados com o todo seu conhecimento. Obrigado por todas as discussões amistosas, sobretudo aquelas sobre as vias de sinalização, as quais despertaram de maneira única o meu interesse pelo assunto.

Agradeço aos professores, Dra. **Marília Trierveiler Martins**, Dra. **Karem L. Ortega**, Dra. **Andréa Mantesso**, e Dr. **Fábio D. Nunes**, por todos os conhecimentos transmitidos e pela agradável convivência.

Agradeço aos amigos do curso **Alexandra, Juliana Schussel, Patrícia, Alexandre e Renata** por todas as conversas, pela agradável convivência como um grupo, pelo aprendizado e por todas as divertidas “pizzadas”.

Agradeço aos amigos do curso **Roberto, Felipe, Yonara, Luciana e Renata Acay**, por todos os momentos agradáveis de aprendizado, por toda a ajuda e a amistosa convivência.

Agradeço a minha amiga do curso **Aluana**, por todas as conversas, e por toda a ajuda fornecida durante a realização deste trabalho, além da agradável convivência. Muito obrigado mesmo.

Agradeço aos amigos do curso **Fábio Coracin, Paulo Brás, Marina, Fabiana, Márcio, Brunno, Fernanda Yamamoto, Fernanda Giudice, Camila Chicaro, Camila Rodini, Aline, Fátima, Flávia, Ronald, Juliana Noguti, Valtuir, Paulo Sérgio, Vanessa, Karin, José Henrique, Felipe Daltoé, Érika, Nelise, Mayra, Marco Aurélio (Magá)** pela convivência fraternal durante todos esses anos, além de todos os conhecimentos transmitidos.

*Agradeço às funcionárias da disciplina de Patologia Bucal, **Zilda, Néia, Nair e Bia**, pelos momentos compartilhados, e por toda a ajuda e suporte em todos os procedimentos acadêmicos.*

*Agradeço às funcionárias da disciplina de Patologia Bucal, **Elisa Santos e Edna Todday (In Memoriam)**, por toda a paciência que tiveram comigo e pela energia inesgotável com a qual me ajudaram sempre que precisei. Muito obrigado mesmo.*

*Agradeço aos meus irmãos e amigos da SDM, **Tom, Téó, Fer, Brum, Luke, Pô, Felipão, Wasa, Andresão, Tuco, Mat e Person**. Por todo o apoio de vocês, e por todas as músicas que tocamos, as quais sempre me inspiraram para as diversas atividades realizadas.*

*Agradeço àqueles que são os meus amigos da turma 94, especialmente aos que me acompanharam durante o curso de pós-graduação na faculdade, **André, Maico e Jonas**, por todos os momentos divertidos e por todo o apoio que tive de vocês.*

*Agradeço à instituição de fomento à pesquisa, **CAPES**, pelo auxílio financeiro prestado, sem o qual não seria possível tamanha dedicação.*

Cortes ARG. Comparação imunoistoquímica das expressões das proteínas p27 e c-jun na carcinogênese intra-oral [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

## RESUMO

A expressão de diversas proteínas do ciclo celular tem sido estudada em vários tipos de lesões malignas. Entre as principais está a p27, que é codificada pelo gene supressor de tumor de mesmo nome, e que já foi encontrada alterada em carcinomas, inclusive os intra-orais. Outra proteína que atua diretamente no controle do ciclo celular é a c-jun, que é codificada por um protooncogene, e através de outras vias de sinalização acaba agindo como um regulador positivo do ciclo. O presente estudo visou comparar as expressões imunoistoquímicas das proteínas p27 e c-jun, através do método da estreptavidina-biotina em 45 casos de displasia epitelial agrupados em diferentes graus (atipia discreta, moderada e intensa), e 20 casos de carcinoma epidermóide intra-oral, na tentativa de elucidar o papel e a relação existente entre estas proteínas. Foi observado uma diminuição dos níveis de p27 e um aumento significativo da c-jun nos casos com graus elevados de displasia epitelial e carcinoma epidermóide. A análise estatística indicou uma correlação inversa estatisticamente significativa entre as expressões de p27 e c-jun. Os resultados sugerem as alterações destas proteínas como um importante evento no processo de carcinogênese intra-oral.

Palavras-Chave: p27, c-jun; Imunoistoquímica; Carcinoma epidermóide; Displasia epitelial



Cortes ARG. Immunohistochemical comparison between the p27 and c-jun proteins expression in the oral carcinogenesis [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2009.

## **ABSTRACT**

The expression of many cell cycle proteins has been studied in a number of malignant lesions. Among the main ones is the p27, which is encoded by the same name tumor suppressor gene, and it is altered in carcinomas, including oral cancers. Another protein that plays a role in the cell cycle control is the c-jun, which is encoded by a proto-oncogene, and acts as a positive regulator of the cell cycle, through other signaling pathways. The present study aimed to compare the immunohistochemical expression of p27 and c-jun proteins, using the streptavidin-biotin method, in 45 cases of epithelial dysplasia, classified in different degrees (mild, moderate and intense), and 20 cases of oral squamous cells carcinoma, in an attempt to elucidate the role and the relationship between these proteins. It was observed a decrease of p27 levels and a substantial increase of c-jun in cases with the highest degrees of epithelial dysplasia. The statistical analysis showed a significant inverse correlation between p27 and c-jun expressions. These results suggest these proteins alterations as an important event in the carcinogenic process.

Keywords: p27, c-jun, Immunohistochemistry; Squamous cells carcinoma; Epithelial dysplasia

## LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 - Expressões imunoistoquímicas da p27 e c-jun.....40

Figura 5.2 - Diagrama de dispersão de p27 e c-jun.....45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Casos estudados e resultados das reações imunoistoquímicas.....	39
Tabela 5.2 - Casos estudados de atipia discreta e resultados das reações imunoistoquímicas.....	41
Tabela 5.3 - Casos estudados de atipia moderada e resultados das reações imunoistoquímicas.....	41
Tabela 5.4 - Casos estudados de atipia intensa e resultados das reações imunoistoquímicas.....	42
Tabela 5.5 - Casos estudados de carcinoma epidermóide e resultados das reações imunoistoquímicas.....	42
Tabela 5.6 - Médias e respectivos desvios padrão de p27 e c-jun segundo o diagnóstico histológico.....	44
Tabela 5.7 - Comparações individuais segundo os tipos histológicos estudados.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDK	Do inglês – Cyclin dependent protein kinase / Proteína quinase dependente de ciclina
CKI	Do inglês – Cyclin dependent kinase inhibitor / Inibidor da quinase dependente de ciclina
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
G0	Gap 0 – intervalo de latência celular
G1	Gap 1 – intervalo após a mitose e antes da síntese de DNA
G2	Gap 2 – intervalo após a síntese de DNA e antes da fase da mitose.
°C	graus Celsius
h	hora
H.E.	Coloração histoquímica por hematoxilina e eosina.
HPV	Do inglês – Human Papillomavirus / Papilomavírus humano
IGF-1	Do inglês – Insulin growth factor 1 / Fator de crescimento dependente de insulina 1
INK4	Do inglês – Inhibitor of cyclin dependent kinase 4 / Inibidor da quinase dependente de ciclina 4
Ki-67	Refere-se ao antígeno Ki-67, cuja expressão é utilizada com índice de proliferação
LSAB	“Link streptavidin biotin complex” – complex de estreptavidina-biotina
M	Fase de mitose do ciclo celular
min	minuto
mm	milímetro
µm	micrometro
mL	mililitro

M	concentração molar ou molaridade
NaCl	cloreto de sódio
n	tamanho da amostra
%	porcentagem
pH	potencial hidrogeniônico
p27	Proteína de 27 kilodaltons da família Cip/kip
pRb	Do inglês – Retinoblastoma protein / proteína relacionada ao gene RB
S	Período de síntese do DNA
TGF- $\beta$	Do inglês – “Transforming Growth Factor – $\beta$ ” / fator transformador de crescimento, relacionado com sinais de controle de proliferação celular
TRIS	Tris-hidroximetil aminometano

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	p. 15
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	17
2.1 Carcinoma epidermóide e lesões potencialmente malignas.....	17
2.2 Ciclo celular .....	19
2.3 Proteína p27 em neoplasias .....	24
2.4 Proteína c-jun e sua influência no ciclo celular.....	28
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	32
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
4.1 Pacientes e amostras teciduais .....	33
4.2 Microscopia de luz .....	33
4.3 Reação imunoistoquímica .....	34
4.4 Análise quantitativa das marcações imunoistoquímicas para p27 e c-jun ..	36
4.5 Análise estatística .....	37
<b>5 RESULTADOS</b> .....	39
5.1 Expressão imunoistoquímica da proteína p27 .....	39
5.2 Expressão imunoistoquímica da proteína c-jun .....	39
5.3 Resultados da análise estatística .....	43
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	53

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as neoplasias malignas mais comuns em seres humanos, o carcinoma epidermóide corresponde a 90% das ocorrências na cavidade bucal, e pode ser precedido por uma série de alterações clínicas na mucosa, que caracterizam as denominadas lesões potencialmente malignas (NAPIER; SPEIGHT, 2008). Entretanto, somente através da aparência clínica da lesão não é possível definir o diagnóstico entre lesões com diferentes graus de atipia celular, e carcinoma epidermóide bucal.

As alterações do ciclo celular que levam ao processo neoplásico tem sido alvo de diversas pesquisas, em busca de prognósticos mais eficientes para os pacientes, e informações como o risco de malignização e o grau de agressividade do tumor. Assim, tornou-se evidente o fato de que as células tumorais apresentam alterações que envolvem defeitos adquiridos por seus genes, os quais na sua maioria codificam proteínas envolvidas direta ou indiretamente no controle da progressão do ciclo celular, sendo o p27 e o c-jun exemplos de algumas das inúmeras proteínas que estão atualmente sendo estudadas.

A proteína p27 é uma das mais pesquisadas proteínas do ciclo celular, e regula negativamente a progressão do ciclo celular, interferindo na formação do complexo formado entre proteínas quinases dependentes de ciclina (CDK) e as ciclinas, inibindo diretamente estas últimas através de sítios específicos de ligação. A sua atuação pode ser induzida por fatores de crescimento como o TGF- $\beta$  (fator de crescimento tumoral) ou por fatores como o contato celular inibitório (KUDO et al., 1998; MINETA et al., 1999). Os trabalhos sobre a p27 tem relacionado a redução dos seus níveis de expressão com prognósticos sombrios em pacientes portadores

de carcinoma. Contudo, o mecanismo da participação da p27 no processo de carcinogênese ainda não está completamente elucidado.

Outra proteína que tem participação ativa no controle do ciclo celular é a c-jun. Esta proteína é da família das proteínas jun (composta pelas proteínas c-jun, junB e junD) e é um dos principais componentes do fator de transcrição AP-1, que é um complexo protéico que se liga a uma região distinta da região promotora do gene da metalotioneína (LEE et al., 1987).

Diante da importância das proteínas p27 e c-jun na carcinogênese, e da relação existente entre estas proteínas descrita por alguns trabalhos, esse estudo visa analisar e comparar a expressão imunoistoquímica dessas proteínas em casos com diferentes graus de atipia celular e em casos de carcinoma epidermóide intra-bucal, buscando avaliar as possíveis correlações existentes entre os aspectos estudados, e demonstrar a importância desses marcadores como fatores prognósticos de lesões pré-malignas.



## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Carcinoma epidermóide e lesões potencialmente malignas.**

As estatísticas oficiais evidenciam que o câncer de boca representa 5% de todas as neoplasias malignas no mundo, chegando a 9% no Brasil. Destes, mais de 90% são representados pelo carcinoma epidermóide (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000), que é uma entidade que surge no epitélio de revestimento, histologicamente caracterizado por apresentar ilhas e cordões de células neoplásicas que invadem o tecido conjuntivo e formam padrões de diferenciação que imitam os epitélios de superfície (SCHEPMAN et al., 1988)

Em 2008, no Brasil foram esperados 234.570 novos casos de câncer para o sexo masculino e 237.480 para sexo feminino. Estimou-se que o câncer de pele não melanoma (115 mil casos novos) seria o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (49 mil e quinhentos), mama feminina (49 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (26 mil), estômago (22 mil) e colo do útero (19 mil) e em sétimo lugar viria o câncer de boca (14 mil) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2007).

O carcinoma epidermóide pode apresentar características clínicas variáveis dependendo do seu padrão de crescimento e do tempo de duração. As lesões normalmente são esbranquiçadas e ou avermelhadas. Podem apresentar superfície plana ou granulosa, usualmente ulcerada com bordas elevadas e endurecidas. As localizações mais acometidas são: a língua, o assoalho bucal, e o palato mole. Em

pacientes fumantes, as lesões são comumente encontradas na região de rebordo alveolar, vestibulo e mucosa bucal (LUMERMAN; FREEDMAN; KERPEL, 1995).

Histopatologicamente, o carcinoma epidermóide apresenta aspectos como a presença de ilhas ou cordões de células epiteliais malignas com capacidade de invadir a lâmina própria adjacente, cuja morfologia por vezes se assemelha com as células epiteliais da camada espinhosa. Estas células epiteliais podem apresentar diversas alterações morfológicas como alterações na relação núcleo/citoplasma, multinucleação, pleomorfismo celular e nuclear, hipercromatismo nuclear, figuras de mitoses atípicas, entre outros. O estroma também pode apresentar alterações que são induzidas pela presença das células neoplásicas, como a neoformação de vasos sanguíneos e infiltrado inflamatório crônico (LUMERMAN; FREEDMAN; KERPEL, 1995; SCHEPMAN et al., 1988).

Estudos anteriores descreveram a etiopatogenia do carcinoma epidermóide como sendo um processo multifatorial envolvendo agentes físicos, químicos e virais, capazes de afetar o metabolismo celular e induzir a proliferação neoplásica (BOYD; READE, 1988; SCULLY, 1993), embora o papel de alguns fatores ainda não esteja totalmente elucidado. Alguns trabalhos também observaram que mesmo na ausência de agentes agressivos pode ocorrer a existência da neoplasia, indicando que alterações genéticas estão intimamente envolvidas no aparecimento das neoplasias (JIN et al., 1999).

O surgimento de alterações clínicas como placas brancas ou avermelhadas na mucosa pode preceder o carcinoma epidermóide (LUMERMAN; FREEDMAN; KERPEL, 1995), caracterizando as lesões pré-malignas, de modo que esse termo não foi adotado por alguns autores, já que nem todas as lesões sofreriam

transformação maligna, tendo sido sugerido o termo lesões potencialmente malignas (LPM) por Johnson et al., (1993).

De acordo com o proposto pela Organização Mundial de Saúde, a leucoplasia pode ser definida como uma placa ou mancha branca que, histologicamente, pode apresentar diferentes graus de displasia epitelial, e que não pode ser caracterizada, clínica ou histopatologicamente, como qualquer outra doença, tendo sua frequência de transformação maligna variando entre 0,13 a 20% dos casos, durante um período de observação de até 30 anos (WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007). Dessa forma, aproximadamente 5% de todas as leucoplasias irão se transformar em carcinoma epidermóide em um período médio de cinco anos (AXELL et al., 1984; BOUQUOT; GORLIN, 1986).

## **2.2 Ciclo celular**

Para que uma célula se reproduza, é necessário que passe por uma seqüência ordenada de eventos que compõem o ciclo celular. Através deste ciclo ocorre a duplicação dos componentes de uma célula e a sua posterior divisão em duas células filhas. Este é um processo que ocorre por toda a vida de organismos multicelulares, para que ocorra a substituição de células danificadas ou perdidas, e que tem como função principal copiar e transferir a informação genética de uma célula para a sua geração seguinte. Para isso, o DNA de cada cromossomo deve ser fielmente replicado e cada uma das células-filhas deve receber uma cópia completa do genoma (ALBERTS, 2002).

Nas células eucarióticas, o ciclo celular é dividido primeiramente em dois períodos que se repetem de maneira constante: a interfase e a mitose. A interfase é o período caracterizado por um crescimento e aumento da atividade celular, sendo dividida em três fases: a fase G1, que corresponde ao período entre o final da divisão celular anterior e o início da duplicação do DNA, no qual ocorre intensa síntese de RNA e proteínas, a fase S, onde ocorre a duplicação do DNA, e a fase G2, que precede a divisão celular, onde ocorre a duplicação dos centríolos e o final do crescimento da célula (ALBERTS, 2002). A célula também pode eventualmente interromper seu ciclo durante a fase G1 e entrar na fase G0, ficando em um estado especializado de repouso, ou seja, tornando-se senescentes (COLLINS; JACKS; PAVLETICH, 1997). A mitose (fase M) é a fase na qual se completa o processo de divisão celular, e compreende a prófase, metáfase, anáfase e telófase, culminando com a separação dos cromossomos em 2 células filhas (ALBERTS, 2002).

A divisão celular é influenciada pelo ambiente extracelular, através de fatores de crescimento e de adesão, e é regulada por um maquinário molecular que opera dentro do núcleo celular, funcionando como o fator que vai decidir se a célula vai proliferar, entrar em estado de quiescência reversível ou em um estado pós-mitótico de diferenciação (LUNDBERG; WEINBERG, 1999).

Dessa forma, o ciclo celular é naturalmente submetido a um complexo mecanismo de controle, de modo que um evento só ocorre se o anterior estiver completo e terminado de maneira correta. Este controle é determinado por uma série de sinais internos que podem parar o ciclo celular quando necessário. Esses sinais são localizados em pontos estratégicos específicos entre as fases do ciclo celular, e são denominados pontos de checagem ou “checkpoints”. Falhas no mecanismo dos “checkpoints” permitem que células geneticamente alteradas sofram divisão celular.

Assim, os defeitos genéticos acabam sendo acumulados nas próximas gerações (GOODGER et al., 1997; HARTWELL; KASTAN, 1994).

Três pontos principais de checagem foram destacados. O primeiro atua entre as fases G1 e S, conhecido como ponto de restrição (R). O Segundo atua entre G2 e M, antes da mitose e o terceiro entre M e G1, no final da mitose (PARDEE, 1989). Dentre estes, o ponto R é considerado por muitos como o mais importante, pois neste ponto, o progresso do ciclo celular é coordenado com o crescimento da célula, disponibilidade de nutrientes e sinais de outras células. Os agentes carcinogênicos exercem o seu maior efeito quando interferem nos genes reguladores da progressão da fase G1 para a fase S, pois a partir desse ponto a célula segue um programa autônomo de divisão (PARDEE, 1989; SHEER, 1996).

Diversos danos genéticos estão diretamente relacionados com o aparecimento das lesões neoplásicas, como alterações específicas em oncogenes e genes supressores de tumor que levam a um descontrole do ciclo celular devido à interrupção de sinais celulares e problemas com a reparação aos danos do DNA (JIN et al., 1999).

A reparação dos danos ao DNA é de suma importância na prevenção do aparecimento de patologias, mas, eventualmente, o dano ocorre em genes-chave nesse processo, como os próprios genes do reparo de DNA, favorecendo a perpetuação de eventuais erros (ORTONNE, 2002). Outros genes e proteínas fundamentais para o funcionamento e divisão celulares também estão envolvidos de forma importante nesse processo. Sinais específicos relacionados à regulação do ciclo celular, diferenciação e apoptose, foram encontrados corrompidos em diferentes tipos de carcinoma (DE GRUIJL; VAN KRANEN; MULLENDERS, 2001).

Nesse contexto de reguladores do ciclo celular, diversas proteínas são consideradas importantes no evento de formação tumoral, como é o caso das ciclinas e das quinases que se relacionam diretamente com essas ciclinas.

Atualmente, é definido que a divisão celular é induzida pela criação de um complexo formado pelas ciclinas — proteínas regulatórias que variam sua concentração e degradação nos diferentes estágios no ciclo celular — e pelas proteínas denominadas quinases dependentes de ciclina (CDK), que se ligam e são ativadas pelas ciclinas, causando a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb) que por sua vez libera o fator de transcrição E2F, induzindo a continuação do ciclo celular (HUNTER; PINES, 1994). Existem também as proteínas que inibem o complexo ciclina-CDK, que são as CKIs, consideradas membros do grupo de genes supressores de tumor.

As CKIs são divididas em duas famílias de proteínas: a família das INK-4 (inibidor da quinase dependente de ciclina 4 ou CDK4) na qual a proteína p16 é o membro mais conhecido; e a família das CIP/kip (proteínas inibitórias das ciclinas), da qual fazem parte as proteínas p21, p27 e p57. Esta última família de proteínas inibe a ação de todos os complexos ciclinas-CDK através de sua ligação a sítios específicos das moléculas de ciclina, podendo interromper o ciclo celular não somente na fase G1 — como fazem as INK4 —, mas em qualquer uma das fases (BRINGOLD; SERRANO, 2000; COLEMAN et al., 1997).

Uma das principais proteínas do ciclo celular que parecem estar ligadas ao processo de carcinogênese é a p27, que já foi encontrada alterada em diversas neoplasias (KUDO et al., 1998; MINETA et al., 1999; YOSHINO et al., 2007; YURAKH et al., 2006), e inclusive em estudos envolvendo carcinomas orais (CHOI et al., 2003; VENKATESAN et al., 1999).

A proteína p27, codificada pelo gene de mesmo nome situado no braço curto do cromossomo 12, tendo sido aceito como localizado no locus 12p12-13.1, apresenta duas regiões responsáveis pela transcrição e região promotora rica em citosina e guanina, homóloga ao gene de rato (ITO et al., 1999; PIETENPOL et al., 1995). Esta proteína ainda não tem o seu mecanismo de atuação elucidado nem compreendido. Entretanto, a p27 apresenta a capacidade de se ligar aos complexos ciclina E/cdk2, ciclina D/cdk4, e ciclina A/cdk2, de modo que a sua interação com esses componentes impede a atividade reguladora dos complexos, principalmente durante a fase G1, não permitindo assim que as células entrem na fase de síntese (NOMURA et al., 1997; POLYAK et al., 1994;).

Alterações genéticas como deleções ou mutações são consideradas raras no gene que codifica a p27, e quando presentes geralmente ocorrem por deleções de apenas um alelo, conferindo ao p27 a característica de haplo-insuficiência (PIETENPOL et al., 1995; FERO et al., 1998). Ainda assim, o p27 atua bioquimicamente como um inibidor do ciclo celular e a sua expressão em algumas células pode controlar negativamente a transição de senescência para proliferação. Diante disso, a grande maioria dos autores aceita a sua designação como sendo gene supressão de tumor (PIETENPOL et al., 1995; WORM et al., 2000).

A atividade do p27 pode ser induzida por sinais extracelulares como o contato celular inibitório, atuação do fator de crescimento transformante (TGF- $\beta$ ), presença do AMP cíclico, drogas inibitórias do crescimento como a rampamicina e privação de soro no caso de células de cultura. Tais fatores aumentam a expressão da p27 que impede a ativação das CDKs e conseqüentemente a fosforilação do pRb, bloqueando assim o ciclo celular na fase G1 (SCULLY, 1993).

Outro fator atualmente estudado que atua bloqueando a atividade do p27 é a ativação de uma das vias de sinalização da carcinogênese, denominada via do Akt. Esta é uma via conhecida por participar do controle positivo do ciclo celular, permitindo a proliferação e sobrevivência de células que apresentam potencial para sofrer mutação. Tal regulação é mediada através da participação de diversos genes dessa e de outras vias — como o c-jun — por vários fatores que acabam sendo desencadeados por essa via, sendo que um dos principais efeitos causados é a fosforilação da p27 (BAGUI et al., 2009; CHOUDHURY, 2001; LI et al., 2007).

### **2.3 Proteína p27 em neoplasias**

Diversas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de estudar os níveis de expressão da p27, determinar o seu papel regulador na carcinogênese e confirmar a possível utilização dessa proteína como marcador biológico para o prognóstico de neoplasias malignas (KUDO et al., 1998; LOACHIM, 2008; TERADA et al., 1999).

Estudos relataram que a redução dos níveis da expressão da proteína p27 está relacionada com uma agressividade maior, prognóstico sombrio e aumento da mortalidade de pacientes portadores de carcinoma (KUDO et al., 1998; MINETA et al., 1999).

Um trabalho sobre carcinomas de próstata sugere que a degradação da proteína p27 ocorre com frequência nesse tipo de neoplasia com prognóstico ruim. O autor ressalta ainda a importância da atenção ao paciente que apresenta alterações



de concentração da p27, considerando a relação existente entre estas alterações e um prognóstico mais sombrio (SEPPA, 1998).

Tsihlias et al. (2000) também observaram a relação entre baixos níveis da p27 e prognósticos piores, após a quimioterapia a base de androgênios, em casos de carcinoma de próstata. Os autores sugerem ainda que a degradação da p27 pode contribuir para o desenvolvimento de metástase e progressão do câncer em resposta aos estímulos androgênicos.

A queda de expressão da proteína p27 foi observada em 47,7% dos casos de carcinoma colorretal analisados por um estudo imunoistoquímico sobre proteínas do ciclo celular. Foram encontradas diversas correlações significativas entre as proteínas estudadas, como a existente entre baixos níveis de p27 e de pRb. Entretanto, não houve relação significativa dos resultados das expressões com fatores relacionados ao prognóstico do paciente. Os autores concluíram então que não se pode considerar nenhuma das proteínas estudadas como marcador seguro de prognóstico para este tipo de carcinoma (LOACHIM, 2008).

Um estudo sobre a atuação da proteína p27 na fotocarcinogênese concluiu que os níveis de expressão da p27 em carcinoma epidermóide de pele causado pelo sol são consideravelmente menores que os mesmos níveis em queratose actínica, que por sua vez são menores que o tecido epitelial cutâneo sem alterações displásicas, sugerindo a p27 como um possível indicador de prognóstico na fotocarcinogênese (OH; PENNEYS, 2004).

O papel da p27 como marcador de prognóstico foi recentemente descrito em casos de carcinoma de mama por Guan et al. (2009). Após a realização de uma meta-análise, os autores concluíram que a presença de níveis reduzidos desta

proteína pode ser considerada como fator independente de prognóstico para este tipo de carcinoma.

O aumento da expressão imunoistoquímica da proteína p27 – a qual indicaria sua inativação por sequestro nos complexos ciclina-cdk – foi descrito e observado por um estudo em casos de hepatocarcinoma. Os autores indicam o fato como plausível para o estudo de um prognóstico preciso da neoplasia (MATSUDA; ICHIDA, 2006).

Fujieda et al., 1999 também observaram tal aumento de expressão, e uma correlação positiva entre este e a ocorrência de apoptose espontânea. O trabalho conclui que a presença da expressão exacerbada da p27 pode ser considerada de modo independente como fator indutor de apoptose.

Um estudo em casos de carcinoma cervical avaliou a expressão das proteínas p27 e ciclina E, correlacionando com dados clínicos e histopatológicos. Foi observada uma expressão menor da p27 nos casos de carcinomas invasivos e nos que apresentavam associação com o vírus HPV, porém não houve correlação significativa entre a expressão da proteína e os parâmetros clínicos (KIM et al., 2000).

Resultados similares para a expressão da p27 em carcinomas cervicais foram encontrados por Cheung et al. (2001) através da reação imunoistoquímica realizada em setenta e três casos. Os autores acrescentam ainda que a p27 não pode ser considerada como marcador independente de prognóstico em carcinomas cervicais.

Um estudo em casos de neoplasias de glândulas salivares avaliou a atuação da proteína p27 como marcadora de prognóstico. Foi realizada a reação imunoistoquímica para a p27 em 29 casos de carcinoma adenóide cístico e em 11 adenomas pleomórficos, permitindo dessa forma a comparação entre neoplasias

benignas e malignas, buscando também correlacionar os resultados obtidos com parâmetros clínicos. Não foi observada correlação entre a diminuição de expressão da p27, a graduação histológica e a sobrevida dos pacientes. Contudo, o número de células positivas para a p27 foi significativamente menor nos casos de carcinoma adenóide cístico que apresentaram metástase. Assim, os autores sugerem que a redução da expressão da p27 pode ser considerada como um bom indicador da possibilidade de metástase, e um possível parâmetro de prognóstico ruim para pacientes com carcinoma adenóide cístico (TAKATA et al., 1999).

Okabe et al. (2001) também avaliaram a expressão imunoistoquímica da proteína p27 em casos de neoplasia maligna de glândulas salivares menores. Foi feita a correlação com os resultados obtidos para Ki-67, com os parâmetros clínicos incluindo idade, sexo, local do tumor, estadiamento clínico e com a graduação histológica de trinta e um casos de carcinoma mucoepidermóide. A análise estatística indicou uma correlação inversa significativa entre a expressão da p27 e a graduação histológica, de modo que a redução dos níveis de p27 foi relacionada com a redução da sobrevida dos pacientes.

O papel de indicador de prognóstico por parte da proteína p27 foi estudado em 35 casos de pacientes com carcinoma epidermóide na cavidade oral e faringe por Venkatesan et al. (1999). Foi realizada uma análise semi-quantitativa que buscou correlacionar os resultados com dados do paciente, localização do tumor, período livre da doença, classificação TNM, graduação histológica e resultados do tratamento. Foi concluído que 95% dos casos com baixos níveis imunoistoquímicos para a p27 faziam parte do grupo que apresentava resposta desfavorável ao tratamento, a maioria com a presença de recidivas ou metástase da neoplasia.

A queda dos níveis de expressão da proteína p27 foi encontrada apresentando uma relação diretamente proporcional com a presença de metástases, redução da taxa de sobrevivência dos pacientes e queda do prognóstico, por diversos estudos que envolvem a carcinogênese oral, fortalecendo o fato da proteína p27 ter um importante papel como indicadora de prognóstico desse processo (KUDO et al., 1998; MINETA et al., 1999; SAITO; NAKAJIMA; MOGI, 1999).

Foi observada também uma relação significativa entre a expressão da p27 com o comportamento de expressões de outras proteínas do ciclo celular. A correlação inversamente proporcional entre as expressões de p27, e de Ki-67 – cuja presença indica ativação da proliferação celular – foi descrita por vários trabalhos envolvendo casos de neoplasias intra-orais (OKABE et al., 2001; SAITO; NAKAJIMA; MOGI, 1999; SCHOELCH et al., 1999).

#### **2.4 Proteína c-jun e sua influência no ciclo celular.**

Outra importante proteína que atua diretamente no ciclo celular, é a c-jun. Esta é uma fosfoproteína nuclear – codificada por um protooncogene – que atua formando o fator de transcrição AP-1 ao se associar com outras proteínas do mesmo tipo. As proteínas da família jun (c-jun, junB e junD) podem formar homo ou heterodímeros que se ligam ao DNA do sítio de ligação do AP-1 (ANGEL; KARIN, 1991; KARIN; LIU; ZANDI, 1997). As famílias de proteínas como essa são compostas por aquelas que têm um zíper de leucina, que é a região necessária para

a formação dos complexos heterodiméricos entre as diferentes famílias (FOLETTA, 1996).

Estudos sobre a proteína c-jun indicam que a participação ativa dessa proteína no ciclo celular envolve o complexo AP-1 e diferentes vias de transdução de sinais (MÜLLER; BRAVO; BURCKHARDT, 1984), e que o bloqueio da expressão destas proteínas inibe a proliferação celular (KOVARY; BRAVO, 1991; RIABOWOL et al., 1988,). Foi constatado ainda que as diferentes combinações das proteínas relacionadas com o fator de transcrição AP-1 participam de mecanismos específicos de controle da expressão de outros genes envolvidos tanto em processos de divisão como na regulação de outros eventos como apoptose e diferenciação celular terminal (KARIN; LIU; ZANDI, 1997)

Uma das principais vias de transdução de sinais que influenciam o complexo AP-1 é a via Ras-MAP quinase (HILL; TREISMAN, 1995). Assim, em cooperação com o oncogene Ras através desta via, a proteína c-jun atua como um regulador positivo da proliferação celular (SCHÜTTE et al., 1989).

Um estudo anterior encontrou um aumento da expressão da proteína c-jun em casos de carcinomas de pulmão. Os autores observaram negatividade para a c-jun em células epiteliais alveolares normais, e positividade em 31% dos tumores primários e metastáticos estudados. Um evento que ocorreu com freqüência foi a marcação positiva para a reação em áreas atípicas próximas ao pulmão (SZABO et al., 1996).

A expressão imunoistoquímica da c-jun foi avaliada por um trabalho em casos de carcinomas primários de mama, juntamente com a associação entre os dados obtidos e as características clínicas e biológicas encontradas. Como resultado, o c-jun apresentou uma correlação positiva com os elementos de sinalização da MAP-

quinase e com diferentes fatores de crescimento. Contudo, não foi observada associação entre aumento da expressão da c-jun e fatores como a graduação histológica dos tumores estudados (GEE et al., 2000).

Um estudo imunoistoquímico sobre essa proteína, realizado em carcinomas epidermóides bucais, revelou que a c-jun estava expressa tanto no citoplasma de células da mucosa normal, como no núcleo de células epiteliais próximas a áreas displásicas, e de células dos carcinomas. Foi sugerido que alterações como essa podem indicar um importante papel do c-jun no processo de carcinogênese bucal (SOUSA et al., 2002).

Turatti et al. (2005), em um estudo imunoistoquímico sobre as proteínas c-jun, c-fos e ciclina D1, observaram uma alta taxa de expressão nuclear da c-jun em casos com displasia epitelial severa e de carcinoma epidermóide intra-oral. Os autores sugerem esse aumento de expressão como um evento precoce no processo de carcinogênese intra-oral.

Açay, Santos e Sousa (2008) analisaram a relação entre a expressão da proteína c-jun na carcinogênese intra-oral com a presença do papilomavírus humano (HPV). A expressão da c-jun aumentou de acordo com o grau de displasia encontrado, indicando seu papel no controle positivo do ciclo celular. Contudo, não houve relação estatística significativa entre a presença do HPV e a expressão da proteína c-jun.

Em um trabalho sobre linfomas de grandes células foi demonstrada uma relação inversa entre as expressões da p27 e da c-jun, foi observado baixos níveis da p27 em casos com alta expressão da c-jun, analisados em linhagens de células através da técnica de *Western Blotting*, sendo sugerido que esta última proteína teria

participação na degradação da p27, o que permitiria a progressão do ciclo celular (RASSIDAKIS et al., 2003).

Li et al. (2007) analisaram a relação da expressão da proteína c-jun com a proliferação de células epiteliais prostáticas em um estudo com cultura de células. Foi concluído que a c-jun possui a capacidade de regular positivamente a proliferação celular através da indução da produção do fator de crescimento dependente de insulina (IGF-1), que ativa outras vias de sinalização da carcinogênese como a do Akt e a da MAP quinase, e a produção de ciclina D1. Os autores observaram também a presença significativa de baixos níveis de p27 em células com presença do fator IGF-1, e com expressão aumentada da proteína c-jun, sugerindo que o gene p27 é um dos principais genes alvo do mecanismo regulatório que promove proliferação celular a partir da ação da proteína c-jun.

Outro estudo comparativo em câncer de mama encontrou uma correlação mais intensa da c-jun com outras proteínas reguladoras do ciclo celular, como a proteína do retinoblastoma, de modo que não houve correlação significativa entre os dados obtidos para c-jun e p27 para esse tipo de carcinoma (MILDE-LANGOSCH et al., 2000). Foi concluído que tanto reguladores positivos como negativos do ciclo celular podem ser influenciados pelos complexos AP-1, e que a relação entre a c-jun e o ciclo celular continua não elucidada.

### 3 PROPOSIÇÃO

Este trabalho tem o propósito de:

1. Avaliar a expressão das proteínas p27 e c-jun através da técnica de imunohistoquímica, em casos com diferentes graus de displasia epitelial e em carcinomas epidermóides intra-orais de diferentes localizações.
2. Correlacionar, através de análises quantitativas e estatísticas, as expressões das proteínas estudadas, e estas com os diferentes tipos de lesões estudadas.



## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Pacientes e amostras teciduais**

Este estudo teve por meta estudar espécimes contendo fragmento de mucosa intra-oral cujo epitélio tenha aspecto de normalidade, casos de displasia epitelial e carcinoma epidermóide intra-oral. O material foi selecionado do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo, que se encontra fixado em formol e embocado em parafina. Foram utilizados 45 casos de displasia epitelial — distribuídos igualmente entre os diferentes graus (discreta, modera e intensa) — e 20 casos de carcinoma epidermóide intra-oral em diferentes localizações. O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo (Anexo A).

### **4.2 Microscopia de luz**

Para a análise morfológica dos casos estudados, foram utilizados cortes de 5  $\mu\text{m}$  estendidos sobre lâminas de vidro e corados pelo método da hematoxilina e eosina. Esta avaliação deu ênfase às atipias presentes no epitélio dos casos de

displasia epitelial, seguindo os critérios da Organização Mundial de Saúde (WARNAKULASURIYA; JOHNSON; VAN DER WAAL, 2007). São eles:

- a) perda da polaridade das células basais;
- b) hiperplasia da camada basal;
- c) projeções epiteliais em gota;
- d) aumento do número de mitoses;
- e) figuras de mitose atípicas;
- f) mitoses em camadas altas do epitélio;
- g) alteração da relação núcleo/citoplasma;
- h) pleomorfismo celular e nuclear;
- i) hiper cromatismo nuclear;
- j) aumento do tamanho do nucléolo;
- k) queratinização individual;
- l) estratificação irregular;
- m) perda da coesão celular.

A gradação histológica de atipia foi feita de acordo com o critério adotado por Bánóczy e Csiba (1976). Quando menos de dois critérios estavam presentes, o epitélio não foi considerado atípico; com a presença de dois, o diagnóstico foi de displasia discreta; de dois a quatro, displasia moderada e cinco ou mais, displasia intensa.

### **4.3 Reação imunoistoquímica**

Para a realização das reações imunistoquímicas foi utilizado o método da estreptavidina-biotina e os cortes submetidos aos anticorpos anti-p27 e -c-jun. Foram obtidos, a partir do material embocado em parafina, cortes de 3  $\mu\text{m}$ , estendidos em lâmina de vidro previamente tratadas pelo 3-aminopropiltriétoxissilano para aumento de adesividade entre o corte tecidual e a lâmina. Os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol, sendo o primeiro a 60 °C, por 30 minutos, e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir, os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanóis, a partir de 3 passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95% e 85%. Após a reidratação, foi feita a remoção do pigmento formólico através de incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%), por 10 minutos. Após lavagem em água corrente e dois banhos em água destilada, as lâminas receberão o tratamento de recuperação antigênica. O tratamento eleito adequado para ambos os anticorpos foi com ácido cítrico com pH=6,0 em banho Maria a 96°C. Com o término do tratamento de recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados em água corrente, durante 10 minutos, então passaram por água destilada e seguiram para a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual, realizada pela incubação em dois banhos de 15 minutos cada em solução 1:1 de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol. Repetida a lavagem em água corrente e a passagem em água destilada, os cortes foram imersos em solução de TRIS pH 7,6, a solução tampão da reação, fazendo-se três banhos de 5 minutos cada. Todas as etapas na seqüência foram precedidas por lavagens em solução tampão de TRIS pH 7,6. Os anticorpos primários foram diluídos em solução tampão de TRIS pH 7,6, acrescidos de albumina bovina a 1%, de acordo com diluição de 1:100 para p27 e 1:200 para c-jun e incubados sobre os cortes durante 30 a 40 minutos. Para a incubação do anticorpo de ligação e do

complexo terciário, foi usado o kit LSAB plus (DAKO, Carpenteria, USA). As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468) através de incubação por 10 minutos e após lavagem em TRIS e água deionizada, para remoção de excessos, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer.

Todos os passos desde a utilização do anticorpo primário até a contra-coloração foram realizados automaticamente com o auxílio de sistema automático de imunocoloração (Autostainer DAKO, DAKO, Carpenteria, USA). Desidratação em série crescente de etanóis seguida de diafanização em xilol e montagem das lamínulas com resina para microscopia, concluíram o preparo dos cortes que seguiram para análise em microscopia de luz. Como controle positivo para a reação da p27 foram utilizados cortes de hiperplasia fibrosa inflamatória com epitélio isento de atipia celular, e com intenso infiltrado inflamatório. Para a proteína c-jun, foram utilizados cortes de carcinoma epidermóide que apresentavam forte marcação para os anticorpos. O controle negativo foi feito pela substituição do anticorpo primário por tampão TRIS e, em uma segunda reação, pela substituição do anticorpo primário por soro normal produzido em animal diferente dos anticorpos primário e secundário.

#### **4.4 Análise quantitativa das marcações imunoistoquímicas para p27 e c-jun**

Todos os casos foram submetidos à análise quantitativa, realizada por apenas um observador. As células foram consideradas positivas ou negativas para o marcador e as variações de intensidade, devido à sua subjetividade, não foram analisadas. As imagens de cada campo foram obtidas através da microscopia 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 conectado a um sistema computadorizado, no qual foi realizada a contagem manual dos núcleos que expressavam as proteínas. Cada proteína foi contada separadamente utilizando o software AxioVision.

O sistema computadorizado consiste em um computador com placa de aquisição de imagem. As imagens do campo obtidas em um microscópio Zeiss-Imager A1, acoplado a uma câmera Zeiss AxioCam HRc, foram transferidas para o monitor conectado ao computador.

#### **4.5 Análise estatística**

Os resultados observados para as expressões da p27 e da c-jun, em cada caso estudado, foram submetidos a cálculos de medidas de tendência central (média, mediana), medidas de dispersão (desvio padrão) e porcentagens.

Para a comparação das médias de p27 e c-jun segundo o tipo histológico de lesão estudada foi realizado o teste de Kruskal-Wallis.

Com o intuito de realizar comparações individuais entre os tipos de tecidos analisados, foi realizado o teste de Mann-Whitney para todas as combinações passíveis de comparação para cada proteína.

Para a verificação de existência de correlação linear entre as variáveis quantitativas relativas às proteínas estudadas, foi utilizado o teste da correlação de Pearson.

Para todos os testes foi estabelecido um erro  $\alpha=5\%$ , isto é, os resultados dos testes foram considerados estatisticamente significativos somente quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Expressão imunoistoquímica da proteína p27

Dos 15 casos com displasia discreta estudados, 10 (66,6%) apresentaram positividade para a p27 (Figura 5.1). O mesmo resultado foi obtido em casos de displasia moderada, enquanto seis (40%) dos 15 casos de displasia intensa foram positivos para essa proteína. Dos 20 casos de carcinoma epidermóide analisados, apenas sete (35%) tiveram expressão positiva da p27 (Tabela 5.1).

### 5.2 Expressão imunoistoquímica da proteína c-jun

Quatro (26,6%) dos 15 casos com displasia discreta estudados, seis (40%) dos 15 casos de displasia moderada, e 11 (73,3%) dos 15 casos de displasia intensa foram positivos para essa proteína (Tabela 5.1). Dos 20 casos de carcinoma epidermóide analisados, 16 (80%) tiveram expressão positiva para a c-jun (Figura 5.1).

Tabela 5.1 – Casos estudados e resultados das reações imunoistoquímicas

Tipos de casos estudados	Total	Expressão imunoistoquímica			
		p27		c-jun	
		Positivos	Negativos	Positivos	Negativos
Displasia Discreta	15	10	5	4	11
Displasia Moderada	15	10	5	6	9
Displasia Intensa	15	6	9	11	4
Carcinoma epidermóide	20	7	13	16	4

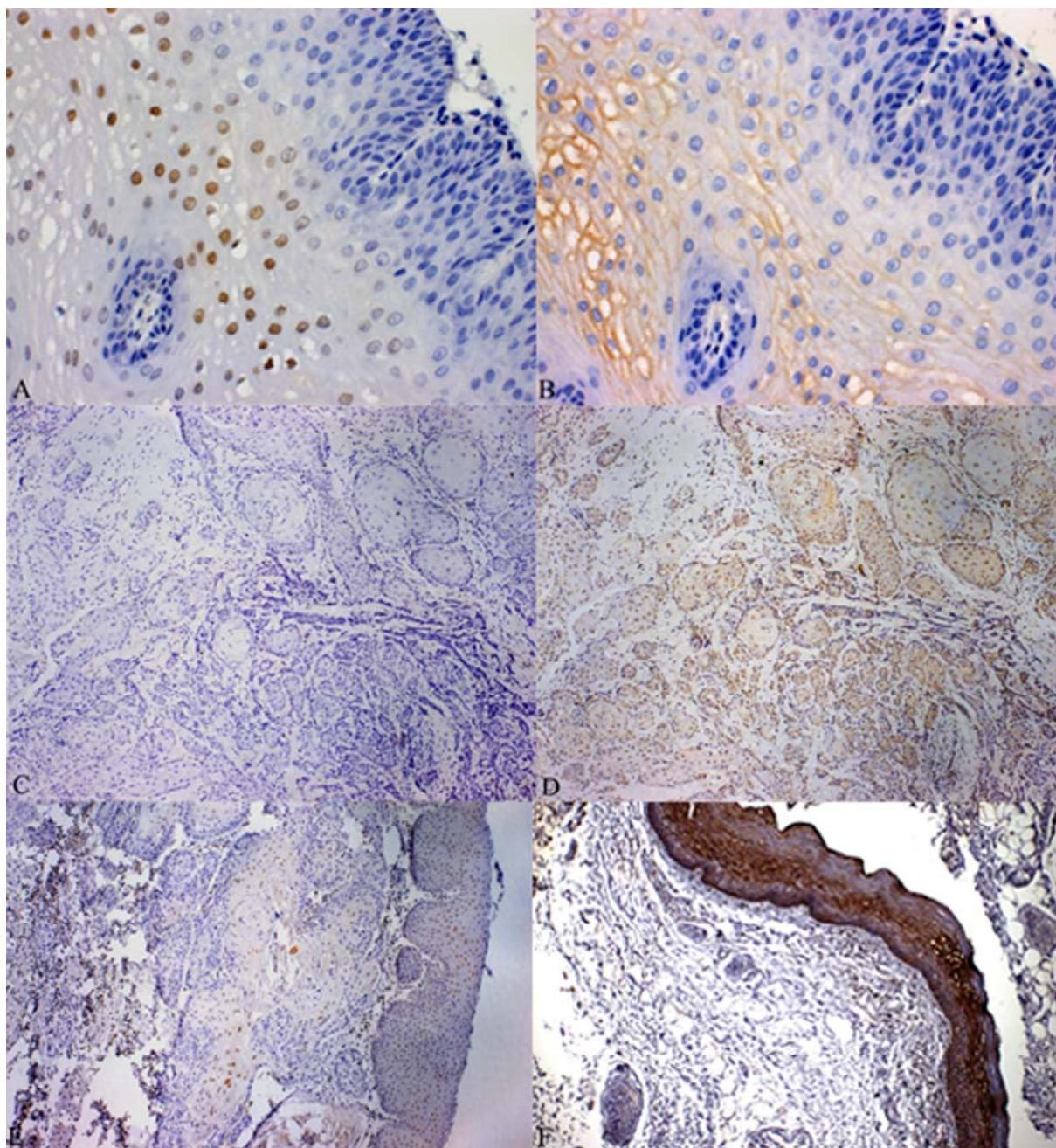


Figura 5.1

- a) Expressão imunoistoquímica da p27 em caso de displasia moderada (400x)
- b) Negatividade para c-jun em caso de displasia moderada (400x)
- c) Negatividade para p27 em caso de carcinoma epidermóide (100x)
- d) Expressão imunoistoquímica da c-jun em caso de carcinoma epidermóide (100x)
- e) Expressão da p27 em caso de carcinoma epidermóide (100x)
- f) Expressão da c-jun em caso de displasia intensa (100x)



Tabela 5.2 – Casos estudados de displasia discreta e resultados das reações imunoistoquímicas

Número dos casos	Porcentagem de núcleos positivos	
	p27	c-jun
40947	42,6	0
39774	29,8	0
51369	9,6	2,2
52412	0	7
41261	21	0
49805	0	15,6
51338	37,4	0
17248	29	0
48822	4,4	0
46282	0	0
41306	34,2	0
43739	0	13,8
33909	31,2	0
43574	41,4	0
43588	0	0

Tabela 5.3 – Casos estudados de displasia moderada e resultados das reações imunoistoquímicas

Número dos casos	Porcentagem de núcleos positivos	
	p27	c-jun
50095	33,2	0
49762	36	0
51355	6,8	2,6
51963	0	9,6
44019	26,6	0
47951	0	19
43705	0	25,8
41994	19,4	0
47527	0	17,2
28814	22,4	0
41190	0	0
28479	18,6	0
50256	16,6	0
45238	8,8	3,8
42300	20,4	0

Tabela 5.4 – Casos estudados de displasia intensa e resultados das reações imunoistoquímicas

Número dos casos	Porcentagem de núcleos positivos	
	p27	c-jun
46122	0	27,8
40724	0	35,2
49222	27	0
44414	9,8	16,4
37988	14,8	0
48228	23,2	0
47050	0	48,2
48288	7,2	20,6
45315	0	55,8
46798	0	44,4
43554	19,8	0
18318	0	31,4
44360	0	41,2
18456	0	34
30745	0	24,2

Tabela 5.5 – Casos de carcinoma epidermóide resultados das reações imunoistoquímicas

Número dos casos	Porcentagem de núcleos positivos	
	p27	c-jun
6348	0	78,8
6285	15,6	0
3213	0	43
3357	0	51,4
6344	0	69,2
3951	0	34,6
62946	29,8	0
62724	0	47,6
62917	0	70,2
62784	12,4	39
62762	0	0
62490	25,4	0
62554	0	89,8
62579	28	42,2
62526	0	82,8
62384	32,6	33,2
62406	0	75,4
62383	0	90,2
62367	0	72,2
62294	17,8	45,6

### 5.3 Resultados da análise estatística

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as médias de p27 ( $p < 0,001$ ) e c-jun ( $p < 0,001$ ), segundo o diagnóstico histológico estudado (Tabela 5.6).

Para a proteína p27, houve diferença significativa entre casos de displasia discreta e moderada ( $p = 0,038$ ), porém o mesmo não foi observado entre displasia moderada e intensa ( $p = 0,140$ ) e entre displasia intensa e carcinoma epidermóide ( $p = 0,933$ ) (Tabela 5.7).

Para a proteína c-jun, não foi encontrada diferença significativa entre casos de displasia discreta e moderada ( $p = 0,44$ ), contudo, foi observada uma nítida significância entre casos de displasia moderada e intensa ( $p = 0,006$ ), e entre displasia intensa e carcinoma epidermóide ( $p = 0,017$ ) (Tabela 5.7).

Realizando os testes para correlação dos marcadores entre si, foi encontrada uma correlação inversa estatisticamente significativa entre p27 e c-jun (Figura 5.2), de modo que os índices de correlação e significância sendo, respectivamente, ( $r = -0,53$ ) e ( $p < 0,001$ ).

Tabela 5.6 – Médias e respectivos desvios padrão de p27 e c-jun segundo o diagnóstico histológico

Variável	Diagnóstico Histológico				p*
	Displasia Discreta	Displasia Moderada	Displasia Intensa	Carcinoma epidemóide	
<b>p27</b>	18,46 (16,97)	13,6 (12,56)	6,6 (9,6)	7,9 (11,88)	p<0,001
<b>c-jun</b>	2,46 (5,04)	5 (8,42)	25 (18,65)	47,95 (30,4)	p<0,001

\* nível de significância estatística segundo o teste de Kruskal-Wallis

Tabela 5.7 – Comparações individuais segundo os tipos histológicos estudados

Variáveis comparadas	Nível de significância estatística segundo o teste de Mann-Whitney.	
	p27	c-jun
Displasia discreta e displasia moderada	p=0,038	p=0,44
Displasia moderada e displasia intensa	p=0,140	p=0,006
Displasia intensa e carcinoma epidermóide	p=0,933	p=0,017
Displasia discreta e displasia intensa	p=0,048	p=0,002
Displasia discreta e carcinoma epidermóide	p=0,043	p<0,001
Displasia moderada e carcinoma epidermóide	p=0,138	p<0,001

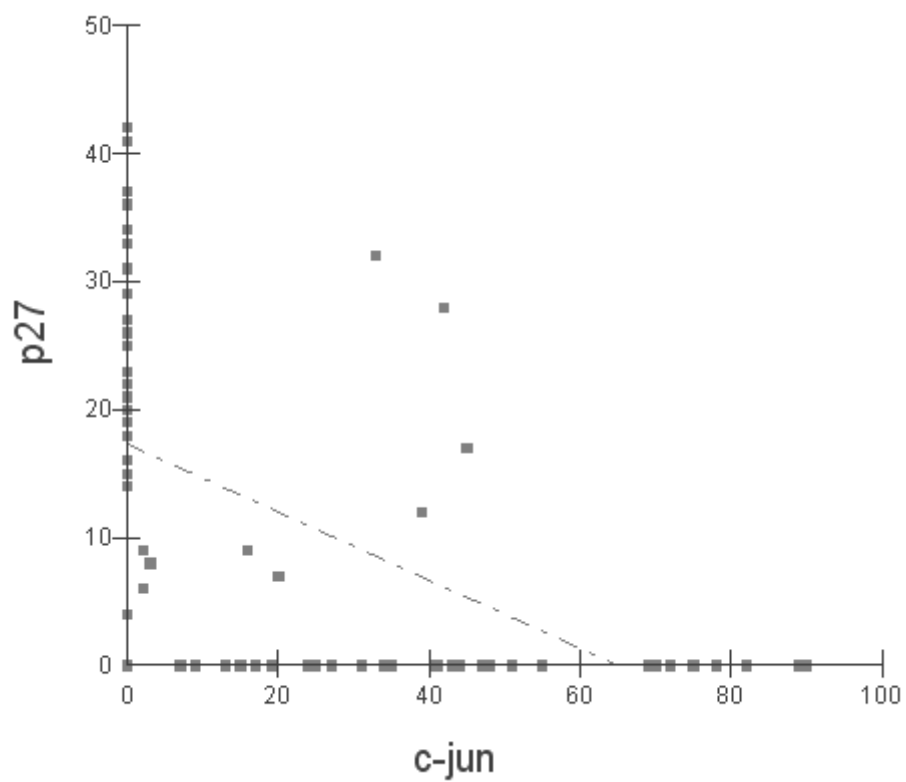


Figura 5.2 – Diagrama de dispersão de p27 e c-jun

## **6 DISCUSSÃO**

É claramente conhecida a importância dos estudos que enfocam o processo de proliferação celular, assim como todo o mecanismo de regulação ao qual o ciclo celular é submetido. Inúmeras pesquisas atuais têm buscado elucidar os aspectos envolvidos nas falhas que ocorrem durante o ciclo celular, originando o processo de carcinogênese, em busca de melhores tratamentos e prognósticos mais precisos. Dessa forma, nosso trabalho teve também como objetivo estudar a expressão das proteínas codificadas por dois genes que influenciam o ciclo celular de maneira direta e participam ativamente do processo de carcinogênese, com o intuito de elucidar as transformações que ocorrem neste processo na cavidade bucal, permitindo então a obtenção de diagnósticos precoces e mais confiáveis, e assim melhores condições para saúde do paciente.

### **6.1 Expressão imunoistoquímica da proteína p27**

As proteínas reguladoras do ciclo celular têm sido pesquisadas por diversos estudos imunoistoquímicos, dentre as quais a p27 é considerada uma das principais participantes na formação de diversas neoplasias, e tem sido considerada como um importante indicador de prognóstico para pacientes com carcinoma epidermóide (GUAN et al., 2009; SEPPA, 1998) incluindo aqueles cuja localização do carcinoma é intra-oral (KUDO et al., 1998; MINETA et al., 1999; SAITO; NAKAJIMA; MORI,

1999), justificando a importância da inclusão desta proteína em um trabalho que visou analisar alterações do mecanismo de controle do ciclo celular.

O papel da proteína p27 na parada do ciclo celular é considerado ativo quando se observa positividade para a expressão desta proteína, ainda que possa ser induzido pela atividade de outras proteínas e fatores externos. A maioria das pesquisas realizadas sobre a p27 suporta os resultados do nosso trabalho que concluiu que a diminuição da sua expressão nas células tumorais pode permitir um aumento da proliferação celular, sendo desta forma proporcional ao grau de malignidade da neoplasia, e assim inversamente proporcional ao prognóstico para pacientes com carcinomas (KUDO et al., 1998; TSHLIAS et al., 2000).

Foi sugerido na literatura que a expressão da p27 presente em células como as musculares normais e inflamatórias ocorre porque estas células não necessitam mais sofrer mitose (FUJIEDA et al., 1999; LEE; CHUANG; HUNG, 1999). Assim, foi considerado que essa característica de marcação poderia ser utilizada como um controle interno positivo para as reações com esta proteína (OHBU; KOBAYASHI; OKAYASU, 2001; YU et al., 2001).

De acordo com os trabalhos encontrados na literatura, a marcação imunohistoquímica da proteína p27 costuma indicar positividade em áreas que usualmente apresentam menores níveis de proliferação celular, como as regiões localizadas perto de pérolas córneas, sendo que o mesmo foi observado no presente estudo. Portanto, as neoplasias com grandes quantidades de arranjos de ninhos de queratina são mais bem diferenciadas e apresentam um menor comprometimento do prognóstico em questão (MINETA et al., 1999; SAITO; NAKAJIMA; MOGI, 1999; OKABE et al., 2001).

Não foi possível encontrar nenhum estudo imunoistoquímico avaliando a p27 em casos com os diferentes graus de displasia epitelial seguindo a classificação da OMS. No entanto, Kövesi e Szende (2006), estudando casos de leucoplasia oral, encontraram resultados similares aos apresentados pelo presente trabalho, em casos com displasia epitelial intensa que tiveram níveis um pouco menores de p27, porém notaram um leve aumento da expressão da p27 em casos com displasia moderada, sugerindo que poderia significar um mecanismo de defesa com a parada do ciclo celular sendo induzida pela proteína nos casos estudados.

## **6.2 Expressão imunoistoquímica da proteína c-jun**

É conhecida a concordância existente entre os pesquisadores sobre a ausência de expressão da c-jun em espécimes de mucosa normal, sendo encontrado em alguns casos um padrão de expressão citoplasmática no tecido epitelial. O aumento da expressão desta proteína em casos de diversos tipos de carcinoma também é descrito na literatura por vários autores, e pode ser considerado como um evento proporcional ao grau de malignidade encontrado (SZABO et al., 1996, GEE et al., 2000; SOUSA et al., 2002; TURATTI et al., 2005; ACAY; SANTOS; SOUSA, 2008).

Os trabalhos encontrados na literatura, que avaliam a expressão da proteína c-jun, levam em conta somente a presença da expressão nuclear desta proteína para que um caso seja considerado positivo (ACAY; SANTOS; SOUSA, 2008; GEE et al., 2000; SZABO et al., 1996; SOUSA et al., 2002; TURATTI et al., 2005), de



modo que tal metodologia foi portanto adotada também pela nossa pesquisa. A presença da expressão citoplasmática da c-jun em alguns casos analisados pelo nosso trabalho foi anteriormente descrita por Szabo et al. (1996). Os autores sugerem que esse padrão de alteração na marcação da proteína poderia indicar uma função para o c-jun nos eventos precoces da carcinogênese pulmonar.

O presente estudo buscou avaliar também o grau de expressão imunohistoquímica da proteína c-jun, em casos com displasia discreta, moderada, intensa e em casos de carcinoma epidermóide intra-oral. Estudos anteriores encontraram uma relação diretamente proporcional da expressão da c-jun com o grau de displasia encontrado, sendo que o grau de expressão mais elevado foi encontrado no carcinoma epidermóide (ACAY; SANTOS; SOUSA, 2008; SOUSA et al., 2002; TURATTI et al., 2005). Esse resultado também foi observado na nossa análise, porém, de uma maneira diferente, já que os números de casos positivos e a porcentagem de núcleos marcados para c-jun nos casos de diferentes graus de displasia epitelial foram consideravelmente menores do que os mesmos dados obtidos pelos outros estudos, o que indica que encontramos uma diferença ainda mais notável entre os casos de displasia epitelial e os de carcinoma epidermóide.

### **6.3 Correlação entre as expressões das proteínas p27 e c-jun.**

Um dos objetivos do nosso trabalho foi analisar, através de métodos estatísticos, a presença de relação entre o comportamento das proteínas p27 e c-jun, que já foi discutida na literatura por estudos envolvendo as diversas vias de

sinalização da carcinogênese e o controle do ciclo celular (RASSIDAKIS et al., 2003; LI et al., 2007).

Trabalhos anteriores avaliaram a relação entre o padrão de expressão dessas duas proteínas e fatores como o gênero do paciente, a localização da lesão, e as características morfológicas encontradas. Contudo, não foi observada nenhuma relação significativa entre os dados obtidos tanto para p27 (GORISCH, 2003) quanto para c-jun (TURATTI, 2003). De modo que com base nos dados encontrados, esta comparação não foi alvo do nosso estudo.

Embora tenha sido pesquisada por poucos artigos, a relação obtida pelo nosso estudo, entre baixos níveis de p27 e o aumento da atividade da c-jun já foi descrita na literatura (RASSIDAKIS et al., 2003; LI et al., 2007). Contudo, ainda que tais proteínas tenham sido estudadas isoladamente através de métodos imunistoquímicos, não foi possível encontrar nenhum trabalho sobre essa relação na carcinogênese intra-oral.

Uma das possíveis explicações sobre tal relação encontrada é o envolvimento da via do Akt relacionado diretamente com a presença do c-jun. Dessa forma, a partir da liberação de fatores como o IGF-1, induzida pela atividade do c-jun, ocorre a ativação da via do Akt, que por sua vez bloquearia a ação da proteína p27 através de uma cascata de fosforilações (LI et al., 2007).

Outra hipótese que explicaria a relação entre c-jun e p27 é baseada na ação da via da MAP quinase. Esta via induz a molécula denominada JUN quinase (JNK) que por sua vez estimula a presença de c-jun no núcleo da célula, e também apresenta uma relação direta com a via do akt, através da ação de proteínas como PAK-1 (*p21-activated-kinase*), culminando na transformação oncogênica celular. Dessa forma, sugere-se que quanto maior a participação da via da MAP quinase no

processo de malignização, mais intenso será o bloqueio da p27 através da via do Akt, e maior será a participação da proteína c-jun em eventos como esse (COBB, 1999; SOMANATH et al., 2009).

Milde-Langosh et al. (2000) estudando a relação entre as proteínas componentes do fator AP-1, e proteínas do ciclo celular através da técnica de *Western Blotting*, encontrou baixos níveis de p27 em alguns casos que expressaram c-jun, porém, diferentemente do encontrado no presente trabalho, não houve correlação significativa na análise estatística. Por outro lado, os autores observaram que houve uma relação significativa entre a c-jun e outras proteínas do ciclo celular como a proteína do retinoblastoma, sugerindo que existem diferentes caminhos através dos quais a c-jun participa da regulação do ciclo celular.

As diferenças encontradas no presente estudo, entre a expressão de p27 e c-jun nos diferentes graus de displasia epitelial e carcinoma epidermóide, poderiam servir como ferramentas auxiliares na avaliação histológica do grau de displasia e estabelecimento do prognóstico relacionado com a carcinogênese, fortalecendo a importância dos estudos que envolvem genes de diferentes vias de sinalização, e que participam de alguma forma como reguladores do ciclo celular.

## 7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

Houve uma diminuição da expressão da proteína p27, e um aumento da proteína c-jun, ambos estatisticamente significativos, em casos com maiores graus de atipia e carcinoma epidermóide.

Houve uma correlação inversa significativa entre as proteínas p27 e c-jun, no estudo da carcinogênese intra-oral.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

Acay RR, Santos E, Sousa SO. Correlation between c-Jun and human papillomavirus in oral premalignant and malignant lesions. *Oral Oncol* 2008;44(7):698-702.

Alberts B. Fundamentos da biologia celular: uma introdução a biologia molecular da célula. Tradução: Augusto Schrack et al. Porto Alegre: Editora Artmed; 2002.

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.

Axéll T, Holmstrup P, Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. International seminar on oral leukoplakia and associated lesion related to tobacco habits. *Community Dental Oral Epidemiol* 1984;12(3):145-54.

Bagui TK, Cui D, Roy S, Mohapatra S, Shor AC, Ma L, et al. Inhibition of p27<sup>Kip1</sup> gene transcription by mitogens. *Cell Cycle* 2009;8(1):115-24.

Bánóczy J, Csiba A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1976;42(6):766-74.

Black HS, de Gruijl FR, Forbes PD, Cleaver JE, Ananthaswamy HN, deFabo EC, Ullrich SE, Tyrrell RM. Photocarcinogenesis: an overview. *J Photochem Photobiol B* 1997;40:29-47.

Bouquot JE, Gorlin RJ. Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23.616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1986;61(4):373-81.

Boyd NM, Reade PC. Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 1988;12(5):193-99.

Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol* 2000;35:317-29.

---

<sup>1</sup> De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Cheung TH, Lo KWK, Yu MMY, Yin SF, Poon CS, Chun TKH, et al. Aberrant expression of p21<sup>waf1/cip1</sup> and p27<sup>kip1</sup> in cervical carcinoma. *Cancer Lett* 2001; 172:93-8.

Choi HR, Tucker SA, Huang Z, Gillenwater AM, Luna MA, Batsakis JG, et al. Differential expressions of cyclin-dependent kinase inhibitors (p27 and p21) and their relation to p53 and Ki-67 in oral squamous tumorigenesis. *Int J Oncol* 2003;22:409-14.

Choudhury GG. Akt serine threonine kinase regulates platelet-derived growth factor-induced DNA synthesis in glomerular mesangial cells: regulation of c-fos AND p27(kip1) gene expression. *J Biol Chem* 2001;276(38):35636-43.

Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71(3-4):479-500.

Coleman KG, Wautlet BS, Morrissey D, Mulheron J, Sedman SA, Brinkley P, et al.. Identification of CDK4 sequences involved in cyclin D1 and p16 binding. *J Biol Chem* 1997;272:18869-74.

Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(7):2776-8.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. *Patologia estrutural e funcional*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000. 1251 p.

de Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH. Uv-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 2001;63:19-27.

Fero M, Randel E, Gurley KE, Roberts JM, Kemp CJ. The murine gene p27<sup>kip1</sup> is haplo-insufficient for tumor suppression. *Nature* 1998;396(6707):177-80.

Foletta VC. Transcription factor AP-1, and the role of fra-2. *Immunol Cell Biol* 1996;74:121-33.

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

Gee JM, Barroso AF, Ellis IO, Robertson JFR, Nicholson RI. Biological and clinical associations of c-jun activation in human breast cancer. *Int J Cancer* 2000;89:177-86.

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

Gorisch MR. Expressão da proteína p27 em carcinomas epidermóides: correlações clínicas e histopatológicas [Tese de Doutorado]. São Paulo Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

Guan X, Wang Y, Xie R, Chen L, Bai J, Lu J, et al. p27<sup>Kip1</sup> as a prognostic factor in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Cell Mol Med* 2009;13(2):132-63.

Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266:1821-8.

Hill CS, Treisman R. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 1995;27:199-211.

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994;79:573-82.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2008 - Incidência de Câncer no Brasil – 2007 [documento eletrônico] Ministério da Saúde.

Ito E, Iwahashi Y, Yanagisawa Y, Suzuki Y, Sugano S, Yuasa Y, et al. Two short sequences have positive effects on the human p27<sup>Kip1</sup> gene transcription. *Gene* 1999;228:93-100.

Jin YT, Myers J, Tsai ST, Goepfert H, Batsakis JG. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma of young adults. *Oral Oncol* 1999;35:251-56.

Johnson RS, Van Lingen B, Papaionnou VE, Spiegelman BM. A null mutation at the c-jun locus causes embryonic lethality and retarded cell growth in culture. *Genes Dev* 1993;7:1309-17.

Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997;9:240-7.

Kim YT, Choi EK, Cho NH, Ko JH, Yang WI, Kim JW, et al. Expression of cyclin E and p27<sup>kip1</sup> in cervical carcinoma. *Cancer Lett* 2000;153:41-50.

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

Kövesi G, Szende B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med* 2006;35(5):274-77.

Kudo Y, Takata T, Yasui W, Ogawa I, Miyauchi T, Takekoshi T, et al. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>kip1</sup> is a indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 1998;83:2447-55.

Lee TH, Chuang LY, Hung WC. Tamoxifen induces p21<sup>WAF1</sup> and p27<sup>KIP1</sup> expression in estrogen receptor-negative lung cancer cells. *Oncogene* 1999;18(29):4269-74.

Lee W, Haslinger A, Karin M, Tijan R. Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40. *Nature* 1987;325:368-72.

Li W, Wu CL, Febbo PG, Olumi AF. Stromally expressed c-Jun regulates proliferation of prostate epithelial cells. *Am J Pathol* 2007;171(4):1189-98.

Loachim E. Expression patterns of cyclins D1, E and cyclin-dependent kinase inhibitors p21<sup>waf1/cip1</sup>, p27<sup>kip1</sup> in colorectal carcinoma: correlation with other cell cycle regulators (pRb, p53 and Ki-67 and PCNA) and clinicopathological features. *Int J Clin Pract* 2008;62(11):1736-43.

Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod* 1995;79(3):321-9.

Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 1999;35(4):531-39.

Matsuda Y, Ichida T. p16 and p27 are functionally correlated during the progress of hepatocarcinogenesis. *Med Mol Morphol* 2006;39:169-75.



Milde-Langosch K, Bamberger AM, Methner C, Rieck G, Löning T. Expression of cell cycle-regulatory proteins rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, cyclin D1 and cyclin E in breast cancer: correlations with expression of activating protein-1 family members. *Int J Cancer* 2000;87:468-72.

Mineta H, Miura K, Suzuki I, Takebayashi S, Amano H, Araki K, et al. Low p27 expression correlates with poor prognosis for patients with oral tongue squamous cells carcinoma. *Cancer* 1999;85:1011-17.

Müller R, Bravo R, Burckhardt J. Induction of c-fos gene and protein by growth factors precedes activation of c-myc. *Nature* 1984;312:716-20.

Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med* 2008;37(1):1-10.

Nomura H, Sawada Y, Fujinaga K, Ohtaki S. Cloning and characterization of rat p27<sup>kip1</sup>, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Gene* 1997;191(2):211-18.

Oh CW, Penneys N. P27 and mib1 expression in actinic keratosis, Bowen disease, and squamous cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 2004;26:22-6.

Ohbu M, Kobayashi N, Okayasu I. Expression of cell cycle regulatory proteins in the multistep process of oesophageal carcinogenesis: setwise over-expression of cyclin E and p53, reduction of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and dysregulation of cyclin D1 and p27<sup>KIP1</sup>. *Histopathology* 2001;39(6):589-96.

Okabe M, Inagaki H, Murase T, Inoue M, Nagai N, Eimoto T. Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland. *Mod Pathol* 2001;14(10):1008-14.

Ortonne JP. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2002;146:20-3.

Pardee AB. G1 events and regulation of cell proliferation. *Science* 1989;246:603-8.

Polyak K, Lee M, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, et al. Cloning of p27kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994;78:59-66

Pientepol J, Bohlander SK, Sato Y, Papadopoulos N, Liu B, Friedman C, et al. Assignment of the human p27kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res* 1995;55:1206-10.

Rassidakis GZ, Claret FX, Lai R, Zhang Q, Sarris AH, McDonnell TJ, Medeiros LJ. Expression of p27(Kip1) and c-Jun activation binding protein 1 are inversely correlated in systemic anaplastic large cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1121-8.

Riabowol KT, Vosatka RJ, Ziff EB, Lamb NJ, Feramisco JR. Microinjection of fos-specific antibodies blocks DNA synthesis in fibroblast cells. *Mol Cell Biol* 1988;8:1670-6.

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

Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol* 1998;34(4):270-5.

Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Ng IO, McMillan A, Ziober BL, et al. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999;35(3):333-42.

Schütte J, Viallet J, Nau M, Segal S, Fedorko J, Minna J. Jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell* 1989;59:987-97.

Scully C. Oncogenes, tumour suppressors and viruses in oral squamous carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993;22(8):337-47.

Seppa N. A protein is pivotal in prostate cancer (cancer-suppressing protein in p27 gene). *Sci News* 1998;154(11):167.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996;274(5293):1672-7.

Somanath PR, Vijai J, Kichina JV, Byzova T, Kandel ES. The role of PAK-1 in activation of MAP kinase cascade and oncogenic transformation by Akt. *Oncogene* 2009;5:125-30.

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;31:78-81.

Szabo E, Riffe ME, Steinberg SM, Birrer MJ, Linnoila I. Altered c-jun expression: an early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Res* 1996;56:305-15.

Takata Y, Kudo Y, Zhao M, Ohgawa I, Miyauchi M, Sato D, Cheng J, Nikai H. Reduced expression of p27<sup>kip1</sup> protein in relation to salivary adenoid cystic carcinoma metastasis. *Cancer* 1999;86:928-35.

Terada Y, Inoshita S, Nakashima O, Tamamori M, Ito H, Kuwahara M, et al. Cell cycle inhibitors (p27<sup>kip1</sup> and p21<sup>cip1</sup>) cause hypertrophy in LLC-PK<sub>1</sub> cells. *Kidney Int* 1999;56(2):494-501.

Tsihlias J, Zhang W, Bhattacharya N, Flanagan M, Klotz L, Slingerland J. Involvement of p27<sup>kip1</sup> in G2 arrest by high dose 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone in LNCaP human prostate cancer cells. *Oncogene* 2000;19(5):670-9.

Turatti E. Avaliação da expressão imuno-histoquímica do c-fos, c-jun e ciclina D1 em lesões epiteliais com variados graus de atipia e em carcinomas da cavidade bucal. [Tese de Doutorado]. São Paulo Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

Turatti E, Neves AC, Magalhães MH, Sousa SO. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Sci* 2005;47:71-6.

Venkatesan TK, pharynx-Kuropakt C, Caldarelli DD, Panje WR, Hutchinson JC Jr, Chen S, et al. Prognostic significance of p27 expression in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Laryngoscope* 1999;109:1329-33.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007;36(10):575-80.

Worm J, Bartkova J, Kirkin AF, Straten P, Zeuthen J, Bartek J, et al. Aberrant p27<sup>kip1</sup> promoter methylation in malignant melanoma. *Oncogene* 2000;19(44):5111-5.

Yoshino A, Katayama Y, Ogino A, Watanabe T, Yachi K, Ohta T, et al. Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas. *J Neurooncol.* 2007;83:153-62.

Yu J, Leung EK, Ng EK, To KE, Eberte MPA, Go MYY, et al. Effect of *Helicobacter pylori* eradication on expression of cyclin D2 and p27 in gastric intestinal metaplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15(9):1505-1511.

Yurakh AO, Ramos D, Calabuig-Farinas S, Lopez-Guerrero JA, Rubio J, Solsona E, et al. Molecular and immunohistochemical analysis of the prognostic value of cell-cycle regulators in urothelial neoplasms of the bladder. *Eur Urol* 2006;50:506-15.

## Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa




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

**PARECER DE APROVAÇÃO**  
**FR - 240082**  
**Protocolo 02/09**

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa: "**Compração imunoistoquímica das expressões das proteínas p27 e c-jun na carcinogênese intra-oral**", de responsabilidade do Pesquisador Arthur Rodriguez Gonzalez Cortes, sob orientação do(a) Profa. Dra. Suzana Catanhede 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, 17 de fevereiro de 2009.

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