

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL**

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS p53 E p21^{WAF1} NAS
DIFERENTES ALTERAÇÕES EPITELIAIS PRESENTES EM LEUCOPLASIAS DA
MUCOSA BUCAL**

FERNANDA VISIOLI

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Dissertação apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

Porto Alegre, agosto de 2007.

Dedico este trabalho aos meus maiores incentivadores, meus pais, Silvana e Sérgio. Por todo sacrifício e por nunca terem medido esforços para que eu pudesse chegar até aqui. E que, além de tudo, nunca deixaram de manter minha existência repleta de amor e carinho. Por tudo isso serei infinitamente grata...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu irmão, **Bruno Marco Visioli**, pela surpreendentemente maravilhosa e divertida convivência. Tua vinda veio para amenizar e alegrar de muitas formas o meu dia-a-dia, obrigada pelo carinho e compreensão.

Às pessoas que fazem enorme diferença na minha vida, meus amigos: **Marina Azevedo, Márcia Payeras, Carolina Dubois da Costa, Tenille Dal Bosco, Eliane Ferlin, Christian Angheben, Adriana Jou Inchausti, Juliana Scalco**. Apesar da distância, estiveram sempre presentes para tornar a minha vida mais feliz. Muito obrigado pela amizade incondicional e por entenderem minhas ausências durante o período do mestrado.

À minha família 'patológica', as pessoas que foram verdadeiramente a minha família nos últimos 2 anos, pelo convívio diário e apoio constante: **Elisabete Rojas, Sabrina Moure, Vinícius Carrard, Leandro Nunes, Rosa Savall**. A nossa amizade foi crescendo à medida que o tempo foi passando, e hoje vocês moram no meu coração. Além de tornaram essa jornada muito mais agradável e divertida, me ajudaram a superar todos os obstáculos, graças ao nosso corporativismo!

Ao meu orientador, professor **Pantelis Varvaki Rados**, por ter participado da minha formação científica, intelectual e também pessoal. Agradeço o incentivo constante, a paciência, os ensinamentos, a compreensão e a dedicação. Obrigado não só pelo exemplo de mestre, mas também pelo exemplo de pessoa que tu és.

Ao professor **Manoel Sant'Ana Filho**, pela sua inteligência, pelo exemplo de professor e pesquisador, por suas idéias e discussões durante todo o período do mestrado.

Às professoras **Anna Cecília Moraes Chaves e Márcia Gaiger de Oliveira** pela acessibilidade, ensinamentos compartilhados e disposição em ajudar.

À **Isabel da Silva Lauxen** pelos conhecimentos divididos e pela prestabilidade constante, sem a qual este trabalho não seria possível.

Ao professor **Onofre Francisco de Quadros**, por ter despertado em mim o gosto pela Patologia, pela inspiração e carinho que contribuíram com a minha formação desde a graduação.

Ao professor **João Jorge Diniz Barbachan**, que apesar do pouco convívio, foi para mim um grande exemplo de mestre, e com certeza o será ainda para muitas gerações futuras de alunos da Patologia.

À **Adriana Aguiar**, agradeço a receptividade, o companheirismo e todo o auxílio prestado.

Ao **Lucas Nunes** pela enorme disposição em ajudar e pelo seu bom-humor que tornou nossas tardes muito mais engraçadas.

À **Laura de Campos Hildebrand** pelo auxílio na confecção deste trabalho.

À **Luciana Adolfo**, pelo auxílio durante a realização das técnicas e na rotina do laboratório.

Às meninas do clubinho da citologia: **Niandra Machado, Ana Carolina Pellicoli e Adriane Fagundes**, pelo ótimo convívio e por sempre estarem dispostas a ajudar.

À **UFRGS** e a **CAPES** por tornarem possível a realização dos meus cursos de Graduação e Pós-Graduação.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

Em mucosa bucal, displasia epitelial é considerada a mais importante característica preditora de risco para transformação maligna de leucoplasias. Como forma de investigar outras características microscópicas de risco este trabalho analisou, através da técnica imunoistoquímica, a expressão de duas proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, p53 e p21^{WAF1}, em diferentes alterações epiteliais. A amostra de leucoplasias foi dividida em 4 grupos conforme seu diagnóstico microscópico: displasia epitelial, acantose, hiperqueratose e acantose associada a hiperqueratose. Foram quantificadas as células positivas na camada basal e suprabasal. Avaliou-se também, de forma qualitativa, a presença de marcação imunoistoquímica nas camadas intermediária ou descamativa, e a presença e o tipo de infiltrado inflamatório subjacente ao tecido epitelial. Não foi constatada diferença estatística significativa entre os grupos para nenhuma variável, entretanto, a expressão de p21^{WAF1} na camada suprabasal das leucoplasias apresentou um aumento contínuo, sendo que a maior quantidade de células positivas foi vista no grupo displasia, seguido do grupo acantose, acantose com hiperqueratose e hiperqueratose. Além disso, 100% das displasias apresentavam marcação positiva na camada intermediária, enquanto que 83% das acantoses, 90% das acantoses com hiperqueratoses e 77% das hiperqueratoses. Encontrou-se uma correlação positiva entre a expressão de p53 e p21^{WAF1}, sugerindo que, nestas lesões, a expressão de p21^{WAF1} é dependente da p53. A expressão imunoistoquímica da p53, apesar de alterada, não está relacionada com a alteração epitelial da leucoplasia. Os resultados sugerem que a acantose pode representar uma alteração epitelial mais severa e, portanto, determinar maior risco de transformação maligna de lesões cancerizáveis.

ABSTRACT

Epithelial dysplasia is recognized as the most important predictive feature to malignant transformation in oral leukoplakias. This study analyze other epithelial abnormalities beyond oral epithelial dysplasia observed in leukoplakias by means immunohistochemical identification of p53 e p21^{WAF1}, that are proteins related to cell cycle control. The leukoplakia sample was separated into 4 groups, according microscopic diagnosis: epithelial dysplasia, acanthosis, hyperkeratosis and hyperkeratosis with acanthosis. Positive-immunolabelling cells from basal and suprabasal layer was counted. Qualitative evaluation of immunolabelling was performed in intermediate and desquamative layer. Inflammatory infiltrate presence and type was evaluated in connective tissue beneath epithelial tissue. No variable showed statistically significant differences between groups. However positive cells for p21^{WAF1} presented a continuous increase in suprabasal layer of leukoplakias. The higher amount of positive cells was observed in dysplasia, followed by acanthosis, hiperkeratosis with acanthosis and hyperkeratosis. In addition, 100% of dysplasias presented intermediate layer immunolabelling, whereas it was observed in 83% of acanthosis, in 90% hyperkeratosis with acanthosis and in 77% of hyperkeratosis. Positive correlation was observed between p53 and p21^{WAF1}, suggesting that, in these lesions, p21^{WAF1} expression depends on p53. Even altered, p53 immunolabelling is not related to leukoplakia epithelial abnormalities. The results suggest that acanthosis may represent a more severe epithelial disturbance, leading to a higher risk of cancerization.

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA	08
2. OBJETIVOS	18
REFERÊNCIAS	19
3. ARTIGO CIENTÍFICO*	25
Introdução	25
Metodologia	27
Resultados	30
Discussão	36
Referências	43
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50
ANEXO..	52

*Artigo científico de acordo com as instruções da revista Oral Oncology.

1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

O câncer de boca representa um problema de saúde pública no Brasil. O INCA estimou para 2006, 10.060 novos casos em homens e 3.410 novos casos de câncer bucal em mulheres. A sobrevida estimada para o câncer bucal é de aproximadamente 30 a 40% em 5 anos (JOHNSON, 1991).

Os principais fatores etiológicos do câncer bucal são o consumo crônico de fumo e álcool, que em conjunto atuam sinergicamente (MAIER *et al.*, 1994; LLELWELYN, MITCHELL, 1994; FRANKS, TEICH, 1996; GIROD *et al.*, 1998; WIGHT, OGDEN, 1998; MORENO-LÓPEZ *et al.*, 2000; ZAVRAS *et al.*, 2001; FIGUERO-RUIZ *et al.*, 2004; INCA).

O carcinoma espinocelular representa 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade bucal, assim é usado, muitas vezes, como sinônimo para o termo câncer bucal (JOHNSON, 1991; LLELWELYN, MITCHELL, 1994; NEVILLE *et al.*; 2004; BARNES *et al.*, 2005). O câncer bucal é mais comum em homens, na faixa etária acima dos 40 anos, e os sítios anatômicos de maior prevalência são o lábio inferior, a borda de língua e o assoalho bucal (SHAFER *et al.*, 1975; JOHNSON, 1991; LLELWELYN, MITCHELL, 1994; ZAVRAS *et al.*, 2001).

A carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, com alterações progressivas sobre o genoma celular, portanto, o desenvolvimento do câncer na mucosa bucal pode ser precedido por uma lesão cancerizável (FRANKS, TEICH, 1996; REIBEL, 2003; MONTENEGRO, FRANCO, 2004). Uma lesão cancerizável consiste em um tecido alterado onde o câncer ocorre mais freqüentemente em comparação a sua contraparte normal. Leucoplasia é a lesão cancerizável mais comum da mucosa bucal. A OMS (1978) define leucoplasia como 'uma placa ou mancha branca, não removida por raspagem e que não pode ser caracterizada clínica ou histopatologicamente como nenhuma outra lesão' (van der WAAL *et al.*, 1997; MAO, 1997; SILVERMAN, 1998).

Da mesma forma que no câncer bucal, o tabaco e o álcool são considerados fatores etiológicos das leucoplasias. A infecção viral está envolvida na patogenia de tipos específicos de leucoplasia, como a leucoplasia pilosa e a leucoplasia verrucosa (van der WAAL *et al.*, 1997; NEVILLE, TERRY, 2002; REIBEL, 2003). Manchas e placas brancas em que é possível identificar uma causa local devem ser

classificadas de acordo e não incluídas entre as leucoplasias (PINDBORG *et al.*, 1997).

Leucoplasia é um diagnóstico clínico e, portanto, não apresenta nenhuma conotação histopatológica. Microscopicamente é diagnosticada de acordo com a alteração epitelial presente: hiperqueratose (orto ou parakeratose), acantose e displasia epitelial; podendo estarem presentes em conjunto ou isoladamente na lesão (van der WAAL *et al.*, 1997; MAO, 1997).

Waldron e Shafer (1975) após análise microscópica de 3256 leucoplasias, constataram que 80,1% apresentavam diferentes combinações de hiperortoceratose, hiperparakeratose e acantose, 12,2% apresentavam displasia epitelial leve a moderada e 4,5% displasia severa ou carcinoma *in situ*. Carcinoma espinocelular foi encontrado em 3,1% das leucoplasias.

A hiperqueratose é um aumento da espessura da camada de orto ou parakeratina (quando há núcleos ou restos nucleares na camada de ceratina). A acantose é o espessamento anormal da camada espinhosa do epitélio, se caracterizando pelo alongamento, embotamento e confluência das papilas epiteliais que resulta em uma união em linha reta com o tecido conjuntivo (SHAFER, HINE, LEVY, 1985; BARNES *et al.*, 2005).

A displasia epitelial é caracterizada por modificações dos processos de renovação e maturação epitelial, resultando em alterações arquiteturais e citológicas (NEVILLE *et al.*, 2004; MONTENEGRO, FRANCO, 2004; BARNES *et al.*, 2005). Segundo Kramer *et al.* (1978), na displasia epitelial podem-se observar as seguintes alterações:

- Aumento do número de figuras de mitoses (algumas atípicas);
- Presença de mitoses na metade superficial do epitélio;
- Aumento da proporção núcleo/citoplasma;
- Nucléolos volumosos;
- Duplicação da camada basal;
- Estratificação epitelial irregular;
- Ceratinização individual ou de grupos de células na camada espinhosa;
- Papilas epiteliais em forma de gota;
- Perda da polaridade das células da camada basal;
- Perda de aderência intercelular;

- Hiperchromatismo nuclear;
- Pleomorfismo celular.

Estudos das décadas de 60 e 70 mostram um risco de transformação maligna de leucoplasias bucais que varia entre 3,6 a 6% (PINDBORG *et al.*, 1963; EINHORN, WERSÄLL, 1967; SILVERMAN, 1968; KRAMER, 1969; ROED-PETERSEN, 1971; BÁNÓCZY, 1977). No entanto, estudos mais recentes, das décadas de 80 e 90, mostram níveis maiores de transformação maligna, que variam entre 8,9 e 17,5% (SILVERMAN, GORSKY, LOZADA, 1984; LIND, 1987; BOUQUOT, WHITAKER, 1994). Apesar de a razão desta diferença ser incerta, critérios de inclusão mais restritivos para o diagnóstico de leucoplasia e diferentes períodos de acompanhamento das lesões podem estar relacionados.

Quando evidência histológica de displasia epitelial está presente o risco aumenta para 36%, portanto, a presença de displasia epitelial é considerada o fator preditor mais importante para transformação maligna de lesões cancerizáveis (KRAMER *et al.*, 1978; SILVERMAN, GORSKY, LOZADA, 1984; LUMERMAN, FREEDMAN, KERPEL, 1995).

As leucoplasias, quanto ao seu aspecto clínico, podem ser classificadas em homogêneas e não-homogêneas e, quando associadas à áreas avermelhadas ou eritoplásticas, são chamadas de leucoplasias salpicadas (NEVILLE, TERRY, 2002). Leucoplasias não-homogêneas e leucoplasias salpicadas possuem maior chance de apresentarem microscopicamente displasia epitelial e carcinoma espinocelular do que as homogêneas (BOUQUOT, WHITAKER, 1994). Pindborg *et al.* (1963) verificaram que 14% das leucoplasias salpicadas apresentavam microscopicamente carcinoma espinocelular e 51% displasia epitelial.

Entretanto, todas as leucoplasias devem ser consideradas suspeitas, pois lesões pequenas e aparentemente inocentes também podem apresentar displasia epitelial ou até mesmo carcinoma espinocelular. Assim, a biópsia e exame histopatológico são sempre indicados (SILVERMAN, 1968; WALDRON, SHAFER, 1975; NEVILLE, TERRY, 2002).

Apesar de as leucoplasias com displasia epitelial apresentarem maior risco de transformação maligna, alguns carcinomas espinocelulares de boca se desenvolvem a partir de leucoplasias sem displasia epitelial (REIBEL, 2003). Silverman, Gorsky e Lozada (1984), após 7,2 anos de acompanhamento, verificaram que 36% das leucoplasias com displasia epitelial sofreram transformação maligna, entretanto, no

mesmo período de acompanhamento, 15% das leucoplasias sem displasia epitelial também sofreram transformação maligna.

Os estudos que avaliam o risco de transformação maligna restringem seu foco na presença ou ausência de displasia epitelial, sem dar maior atenção as diferentes alterações presentes no epitélio das leucoplasias bucais, quando displasia epitelial não está presente.

Hildebrand (2005) avaliou leucoplasias bucais e, utilizando a técnica de AgNOR, comparou o ritmo de proliferação celular de diferentes alterações epiteliais. Observou que leucoplasias com acantose, hiperqueratose e acantose associada a hiperqueratose apresentam ritmo de proliferação celular alterado, visto que, a velocidade de proliferação era maior na camada suprabasal do epitélio. No entanto, a acantose apresentou comportamento mais semelhante a displasia epitelial, pois também apresentou alterações, aumento do número de AgNORs, nas células da camada basal.

Muitas neoplasias malignas humanas são resultantes de falhas no controle da proliferação celular, devido a defeitos na regulação do ciclo celular (FRANKS, TEICH, 1996; ALBERTS *et al.*, 1999; COOPER, 2001).

A p53 é uma das principais proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular. Determina o bloqueio do ciclo no ponto de restrição em final de G1, na presença de DNA danificado. A suspensão do ciclo celular permite que a célula repare o DNA antes que este seja duplicado, se o dano persiste ou não pode ser reparado, a p53 desencadeia a morte celular por apoptose (KO, PRIVES, 1996; RAYBAUD-DIOGÈNE *et al.*, 1996; ALBERTS *et al.*, 1999; PRIVES, HALL, 1999; REIBEL, 2003).

Mutações no gene *TP53* são as alterações genéticas mais encontradas no câncer, ocorrendo em, aproximadamente, 70-75% de todas as neoplasias malignas (FRANKS, TEICH, 1996; REIBEL, 2003), e em 40-50% no câncer bucal (NYLANDER, DABELSTEEN, HALL, 2000). O *TP53* é um gene supressor de tumor, sendo que mutações, freqüentemente, resultam em uma proteína não-funcional, permitindo que ocorra falha no reparo do DNA, dessa forma a célula prolifera ao invés de sofrer apoptose, favorecendo o surgimento de outras mutações (FRANKS, TEICH, 1996; RAYBAUD-DIOGÈNE *et al.*, 1996; MAO, 1997; COX, 1997; WHYTE, BROTON, SHILLITOE, 2002).

A proteína p53 possui uma meia-vida curta (aproximadamente 20 minutos), entretanto, muitos trabalhos demonstram que, em lesões cancerizáveis e no câncer

bucal, existe um aumento da sua expressão imunoistoquímica, sugerindo que alterações na expressão de p53 ocorrem em estágios iniciais da carcinogênese (SHIN *et al.*, 1994; CRUZ *et al.*, 1998; KUROKAWA *et al.*, 2003; SANTOS-GARCÍA *et al.*, 2005).

Shin *et al.* (1994) estudaram a expressão imunoistoquímica de p53 em carcinomas espinocelulares bucais e no epitélio de revestimento e em lesões cancerizáveis adjacentes a estes carcinomas. A expressão de p53 aumentou progressivamente de hiperplasia para displasia epitelial e para carcinoma espinocelular. Observou-se marcação positiva em 45% dos casos de carcinomas, enquanto que, em 21% do epitélio morfológicamente normal adjacente, sendo que essa marcação ocorria em algumas poucas células da camada basal, 29% hiperplasias e 45% displasias epiteliais. Nas hiperplasias e displasias a marcação se expandia para as camadas parabasais e superficiais do epitélio. Em amostras controle de pacientes não-fumantes não houve marcação de p53.

Cruz *et al.* (1998) avaliaram 35 lesões cancerizáveis com displasia epitelial, observaram que 11 transformaram-se em carcinoma espinocelular durante um acompanhamento de 1 a 16 anos. Das 35 lesões, 7 apresentavam expressão suprabasal da p53 e dessas, 6 progrediram para carcinoma. Dezenove amostras apresentavam expressão basal da p53, das quais 3 progrediram, as restantes 9 eram negativas para p53 e dessas 2 sofreram transformação maligna. Expressão imunoistoquímica da p53 acima da camada basal do epitélio foi um forte indicador de transformação neoplásica, mesmo na ausência de displasia epitelial.

Kurokawa *et al.* (2003) realizaram um estudo imunoistoquímico em leucoplasias bucais com e sem displasia epitelial. Verificaram que a expressão de p53 foi limitada às camadas basal e suprabasal no epitélio normal, tornou-se mais distribuída nas camadas epiteliais das leucoplasias e aumentou em associação com o aumento da severidade da displasia epitelial.

Santos-García *et al.* (2005) avaliaram a expressão imunoistoquímica de p53 e Ki-67 em amostras de epitélio morfológicamente normal, displasias epiteliais moderadas, carcinomas *in situ* e carcinomas espinocelulares. Constataram que a progressão da severidade do quadro histológico estava associada a um aumento da proliferação celular, demonstrado pelo Ki-67, e da expressão de p53.

Inicialmente a detecção imunoistoquímica de p53 era considerada um marcador de presença de mutação em seu gene, pois uma proteína mutante pode

ser estabilizada e ter sua meia-vida aumentada (RAYBAUD-DIOGÈNE *et al.*, 1996; ROWLEY *et al.* 1998; NYLANDER, DABELSTEEN, HALL, 2000). Contudo, essa correlação nem sempre é confirmada, como demonstraram Matsumura *et al.* (1996) que observaram que dos 22 carcinomas espinocelulares bucais e das 4 leucoplasias bucais em que foi detectada expressão imunistoquímica de p53, 11(50%) e 3 (75%), respectivamente, não apresentavam mutação genética.

Estudos comprovaram que a proteína pode ser estabilizada e expressão imunistoquímica de p53 pode ocorrer em função de determinados processos fisiológicos, na presença de DNA danificado e hipóxia, por exemplo. Além do mais, inibição da interação com a proteína mdm2, que promove a degradação da p53 pela via de ubiquitinação, também resultará no acúmulo da proteína na célula. A ligação de p53 com proteínas virais como SV40, E6-HPV e adenovírus E1A causa estabilização da proteína, porém essa se torna inativa. (HALL, LANE, 1994; COX, 1997; SAVE, NYLANDER, HALL, 1998; PARTRIDGE *et al.*, 1999; HALL, McCLUGGAGE, 2006).

Para exercer suas funções a p53 atua como um fator de transcrição e através da interação com diversas proteínas celulares e diferentes sinalizações, ativa genes-alvos, se ligando a seqüências específicas de DNA localizados nos seus promotores (PRIVES, HALL, 1999; COOPER, 2001; WHYTE, BROTON, SHILLITOE, 2002).

Para que ocorra bloqueio do ciclo celular a p53 estimula a transcrição da proteína p21^{WAF1}, que é codificada pelo gene *WAF-1*. A proteína p21^{WAF1} atua como uma inibidora de complexos Cdk/ciclina (CKI) no ciclo celular (XIONG *et al.*, 1993; HARADA, OGDEN, 2000; COOPER, 2001; WHYTE, BROTON, SHILLITOE, 2002).

A p21^{WAF1} forma um complexo quaternário com ciclina, cdk e com PCNA, assim evita a fosforilação da proteína pRb pelo complexo ativo ciclina/cdk, inibindo a progressão do ciclo celular de G1 para a fase S (XIONG *et al.*, 1993; KUO *et al.*, 2002). Pode também, quando ligada ao antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), inibir diretamente a replicação do DNA na fase S, pois bloqueia a ligação da DNA polimerase com o PCNA (LI *et al.*, 1996; COOPER, 2001; WHYTE, BROTON, SHILLITOE, 2002).

Apesar de ser classificada como CKI (proteína inibidora de cdk), p21^{WAF1} possui efeitos positivos e negativos sobre a progressão do ciclo celular em G1. Pode agir como uma proteína adaptadora para complexos ciclina/cdk. Geralmente ciclina e cdk se ligam rapidamente e com alta afinidade, porém alguns complexos,

especialmente ciclina D/cdk4, não possuem esta afinidade, necessitando de um fator de ligação (LABAER *et al.*, 1997). Níveis basais de p21^{WAF1} são necessários para ativar e unir complexos ciclinaD/cdk4, assim p21^{WAF1} estimula a ligação e é um dos componentes do complexo ativo. Portanto, os complexos ciclina/cdk contendo p21^{WAF1} podem existir tanto na forma ativa quanto na forma inativa. Complexos com apenas uma molécula de p21^{WAF1} são ativos, enquanto que os complexos inativos contêm múltiplas moléculas de p21^{WAF1} (ZHANG, HANNON, BEACH, 1994; COX, 1997; LABAER *et al.*, 1997; NG *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 1999; WEINBERG, DENNING, 2002).

Foi demonstrado que p21^{WAF1} também está envolvida com o processo de apoptose, no entanto, a natureza desta relação ainda é incerta. Em determinados momentos foi constatado que atuaria de forma antiapoptótica, protegendo as células da apoptose induzida por TGF- β , TNF- α e IFN- γ , por exemplo. Também pode atuar sinergicamente com o antiapoptótico Bcl-2, ou então, inibindo as moléculas proapoptóticas procaspase-3 e ASK1. Entretanto, verificou-se que a expressão de p21^{WAF1} aumenta a morte celular em resposta à cisplatina em certas linhagens celulares malignas, agindo assim de forma proapoptótica (TIMOFEEV, POSPELOVA, POSPELOV, 2004; GARTEL, 2005).

A diferenciação de muitos tipos de tecidos, incluindo o epitélio escamoso, é acompanhada de aumento da expressão de p21^{WAF1} (EL-DEIRY *et al.*, 1995), pois a interrupção do ciclo celular é o primeiro passo para que a célula possa sofrer diferenciação (HARADA, OGDEN, 2000).

A expressão imunoistoquímica de p21^{WAF1} em tecidos adultos apresenta um padrão associado com diferenciação celular (MATEO *et al.*, 1997). El-Deiry *et al.* (1995) estudando o epitélio do trato gastrintestinal observou que a p21^{WAF1} passa a se expressar assim que a célula deixa o compartimento proliferativo, que se caracteriza pela camada basal, no estudo evidenciado pela marcação imunoistoquímica com Ki-67, e migra para uma camada superior. A p21^{WAF1} age inibindo a atividade proliferativa destas células para que se estabeleça o processo de diferenciação, porém a expressão de p21^{WAF1} cessa nas células já diferenciadas das camadas mais superficiais, sua expressão fica confinada a uma camada intermediária.

No epitélio estratificado bucal a expressão imunoistoquímica da p21^{WAF1} ocorre principalmente na camada suprabasal com a marcação de células isoladas

(VAN OIJEN *et al.*, 1998; NG *et al.*, 1999; SCHOELCH *et al.*, 1999; XIE, CLAUSEN, BOYSEN, 2002; MERNE *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2003), porém sua expressão também é observada na camada espinhosa de forma menos freqüente (YOOK, KIM, 1998; VAN OIJEN *et al.*, 1998; XIE, CLAUSEN, BOYSEN, 2002; KUO *et al.*, 2002).

Em leucoplasias, que apresentam hiperplasia ou displasia, observa-se marcação imunoistoquímica nas camadas mais superiores e diferenciadas do epitélio, níveis muito baixos são detectados na camada basal (AGARWAL *et al.*, 1998; MERNE *et al.*, 2002). A expressão de p21^{WAF1} aumenta em número de células e em intensidade de marcação com a progressão da displasia de leve a moderada e severa (CHOI *et al.*, 2003). Em mucosa hiperplásica ou displásica adjacente a carcinomas, expressão da p21^{WAF1} é vista em todo epitélio, inclusive na camada basal (YOOK, KIM, 1998).

Nos carcinomas espinocelulares bucais a expressão de p21^{WAF1} atinge toda extensão do epitélio das ilhas tumorais, a maioria dos ceratinócitos neoplásicos apresentam marcação imunoistoquímica para p21^{WAF1} (SCHOELCH *et al.*, 1999; ADEGBOYEGA, BOROMOUND, FREEMAN, 2005).

Níveis elevados observados em carcinomas espinocelulares, sugerem que p21^{WAF1} não consegue inibir a progressão do ciclo celular em células cancerosas. Parece haver um mecanismo pelo qual as células proliferativas podem tolerar este inibidor da progressão do ciclo celular. Possivelmente devido à presença de outros fatores que promovem a carcinogênese e que se sobressaem à função da p21^{WAF1} (AGARWAL *et al.*, 1998; NG *et al.*, 1999; HARADA, OGDEN, 2000; MIETTINEN *et al.*, 2001; WEINBERG, DENNING, 2002; KUO *et al.*, 2002; NEVES *et al.*, 2004).

Van Oijen *et al.* (1998) verificaram que parte das células que expressavam p21^{WAF1} eram células proliferantes, demonstrado pela incorporação com BrdU, o autor sugere que o aumento da expressão de ciclina D1 supera o efeito inibitório de p21^{WAF1}. O aumento nos níveis de ciclinas D pode promover o seqüestro de p21^{WAF1}, para formação de complexos ciclinaD/cdk4, assim complexos ciclinaE/cdk2, que fosforilam pRb, ficam livres das ações inibitórias de p21^{WAF1} (CHENG *et al.*, 1999). A proteína oncogênica c-myc pode se ligar à terminação carboxila de p21^{WAF1}, rompendo sua ligação com PCNA e, portanto bloqueia a inibição da replicação de DNA dependente de PCNA (KITAURA *et al.*, 2000). A oncoproteína E7 do vírus do papiloma humano HPV-16 (16E7) bloqueia a habilidade da p21^{WAF1} de inibir tanto

complexos ciclina/cdk quanto, a replicação de DNA dependente de PCNA (FUNK *et al.*, 1997).

Mutações que inativam o gene *WAF-1*, ou que produzam uma proteína não-funcional, podem contribuir para a transformação maligna celular. Todavia, mutações no gene *WAF-1* são muito pouco relatadas (COX, 1997). Shiohara *et al.* (1994) examinou 315 amostras de 14 diferentes tipos de neoplasias humanas e nenhuma mutação de *WAF-1* foi detectada. Em câncer bucal também nenhuma mutação foi detectada (HARADA, OGDEN, 2000), indicando que seu envolvimento na carcinogênese acontece relacionado aos níveis da proteína e não a nível gênico (COX, 1997).

A indução de p21^{WAF1} é um acontecimento intermediário comum para diversas vias de sinalização que levam à pausa do ciclo celular (YOOK, KIM, 1998; WEINBERG, DENNING, 2002). Existem diferentes formas de indução de p21^{WAF1}, independentes da p53, que ocorrem, principalmente, em resposta a fatores de crescimento e a agentes de diferenciação celular (NADAL *et al.*, 1997). Ambos os mecanismos, dependentes e independentes de p53, estão envolvidos na regulação de p21^{WAF1} na carcinogênese (HARADA, OGDEN, 2000), pois, muitas vezes, a falta de correlação entre a expressão de p53 e de p21^{WAF1} foi encontrada e tumores com p53 não-funcional, mutada, expressaram p21^{WAF1} (NADAL *et al.*, 1997; YOOK, KIM, 1998; VAN OIJEN *et al.*, 1998; WARNAKULASURIYA, TAVASSON, JOHNSON, 1998; AGARWAL *et al.*, 1998; SCHOELCH *et al.*, 1999; XIE, CLAUSEN, BOYSEN, 2002; KUO *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 2003; NEMES, NEMES, MÁRTON, 2005).

O aumento da expressão de p21^{WAF1}, observada não somente em carcinomas bucais, mas também em lesões cancerizáveis, sugere que a alteração no padrão de expressão de p21^{WAF1} é um evento precoce na carcinogênese bucal. Assim, esta alteração pode ser um evento que contribui ou então, reflete a carcinogênese no epitélio bucal (WARNAKULASURIYA, TAVASSON, JOHNSON, 1998; WEINBERG, DENNING, 2002).

As leucoplasias bucais apresentam freqüentemente, um infiltrado inflamatório subjacente ao tecido epitelial. A agressão causada pelos carcinógenos presentes no fumo e álcool, e a infecção viral, presente em tipos específicos de leucoplasias, podem suscitar inflamação tecidual, imunidade celular e também a vigilância imunológica (van der WAAL *et al.*, 1997).

Este processo inflamatório pode causar alterações no padrão de proliferação celular epitelial (REIBEL, 2003). O comportamento da célula epitelial na presença de um processo inflamatório crônico ainda é pouco compreendido. A inflamação das estruturas de suporte do elemento dentário, a doença periodontal, resulta, freqüentemente, em aumento da proliferação do tecido epitelial do sulco gengival e da bolsa periodontal (HAAPASALMI *et al.*, 1995). Durante o processo inflamatório fagócitos ativados liberam óxidos altamente reativos que podem causar dano ao DNA das células circunvizinhas (WEITZMAN, *et al.*, 1985). Inflamação persistente leva a dano tecidual, resultando no aumento do turnover celular. Óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS), derivados de células inflamatórias, podem causar dano ao DNA celular (YOSHIMURA, 2006).

O processo inflamatório pode induzir alterações nos processos de proliferação e diferenciação celular imitando aquelas que ocorrem nas lesões cancerizáveis (REIBEL, 2003). Lesões inflamatórias crônicas como o líquen plano, podem apresentar características displásicas no seu epitélio (MACDONALD, RENNIE, 1975).

Kaplan *et al.* (1998) realizaram um estudo em amostras de epitélio bucal inflamado, provenientes de lesões hiperplásicas papilomatosas do palato, que representam lesões sem risco de transformação maligna. Observaram um significativo aumento de células marcadas imunoistoquimicamente com p53 e com PCNA, quando comparadas a amostras de epitélio de palato sem alterações.

De Paula *et al.* (2000) estudaram ceratocistos e verificaram maior quantidade de células positivas para marcadores de regulação do ciclo celular (PCNA, Ki-67, AgNORs) em amostras com presença de processo inflamatório em comparação a ceratocistos sem inflamação.

A partir dos dados presentes na literatura, é possível que a marcação imunoistoquímica de p53 e p21^{WAF1} possa ser alterada em função da presença de um processo inflamatório subjacente ao tecido epitelial analisado, dessa forma, não refletirá o real significado biológico destes marcadores moleculares.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a marcação imunoistoquímica das proteínas p53 e p21^{WAF1} em leucoplasias da cavidade bucal com as seguintes alterações epiteliais: acantose, hiperkeratose, acantose associada a hiperkeratose e displasia epitelial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Comparar quantitativamente entre os grupos a marcação imunoistoquímica da proteína p53 nas camadas basal e suprabasal do epitélio;
- ✓ Comparar qualitativamente entre os grupos a marcação imunoistoquímica da proteína p53 nas camadas intermediária e descamativa do epitélio;
- ✓ Comparar quantitativamente entre os grupos a marcação imunoistoquímica da proteína p21^{WAF1} nas camadas basal e suprabasal do epitélio;
- ✓ Comparar qualitativamente entre os grupos a marcação imunoistoquímica da proteína p21^{WAF1} nas camadas intermediária e descamativa do epitélio;
- ✓ Verificar se existe associação entre a expressão imunoistoquímica das proteínas p53 e p21^{WAF1} nos grupos estudados.
- ✓ Verificar se existe associação entre a presença e o tipo de infiltrado inflamatório adjacente ao tecido epitelial e a expressão imunoistoquímica das proteínas p53 e p21^{WAF1}.

REFERÊNCIAS

- ADEGBOYEGA, P.A.; BOROMOUND, N.; FREEMAN, D.H. Diagnostic utility of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in verrucous squamous carcinoma. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 13, p. 171-177, 2005.
- AGARWAL, S. *et al.* Expression of cyclin dependent kinase inhibitor p21^{Waf1/Cip1} in premalignant and malignant oral lesions: relationship with p53 status. **Oral Oncol.**, v. 34, p. 353-360, 1998.
- ALBERTS, B. *et al.* **Fundamento da Biologia Celular: Uma Introdução à Biologia Molecular da Célula.** Porto Alegre: Artmed, 1999. 756 p.
- BÁNÓCZY, J. Follow-up studies in oral leukoplakia. **J. Maxillofac. Surg.**, v. 5, p. 69-75, 1977.
- BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P. *et al.* Epithelial Precursor Lesions. In: BARNES, L.; EVESON, J.W.; REICHART, P. *et al.* **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.** Lyon: IARC Press, 2005. Cap. 4, p. 177-179.
- BOUQUOT, J.E.; WHITAKER, S.B. Oral leukoplakia-Rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or "phases." **Quintessence Int.**, v. 25, p. 133-140, 1994.
- CHENG, M. *et al.* The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. **EMBO**, v. 18, p. 1571-1583, 1999.
- CHOI, H. *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.**, v. 22, p. 409-414, 2003.
- COOPER, G.M. **A célula: uma Abordagem Molecular.** 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2001. 712 p.
- COX, L.S. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}. Review. Article. **J. Pathol.**, v. 183, p. 134-140, 1997.
- CRUZ, I.B. *et al.* p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. **J Pathol.**, v. 184, p. 360-368, 1998.
- De PAULA, A.M.B. *et al.* Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation. **J. Pathol. Med.**, v. 29, p. 477-482, 2000.
- EINHORN, J.; WERSÄLL, J. Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of the oral mucosa. **Cancer**, v. 20, p. 2189-2193, 1967.

EL-DEIRY, W.S. *et al.* Topological control of p21^{Waf1/Cip1} expression in normal and neoplastic tissues. **Cancer Res.**, v. 55, p. 2910-2919, 1995.

FIGUERO-RUIZ, E. *et al.* Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. **Med. Oral**, v. 9, p. 14-23, 2004.

FRANKS, L.M.; TEICH, N.M. **Introduction To The Cellular And Molecular Biology Of Cancer**. 3 ed. Oxford: Oxford University Press, 1996. 458 p.

FUNK, J.O. *et al.* Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. **Genes Dev.**, v. 11, p. 2090-2100, 1997.

GARTEL, A.L. The conflicting roles of the cdk inhibitor p21^(CIP1/WAF1) in apoptosis. **Leuk. Res.**, v. 29, p. 1237-1238, 2005.

GIROD, S.C. *et al.* Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. **Br. J. Oral Max. Surg.**, v. 36, p.252-260, 1998.

HAAPASALMI, K. *et al.* Expression of epithelial adhesion proteins and integrins in chronic inflammation. **Am. J. Pathol.**, v.147, p. 193-206, 1995.

HALL, P.A.; LANE, D.P. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? –Revisited!. **J. Pathol.**, v.172, p. 1-4, 1994.

HALL, P.A.; McCLUGGAGE, W.G. Assessing p53 in clinical contexts: unlearned lessons and new perspectives. **J. Pathol.**, v. 208, p. 1-6, 2006.

HARADA, K.; OGDEN, G.R. An overview of the cell cycle arrest protein, p21^{WAF1}. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 3-7, 2000.

HILDEBRAND, L.C. **Quantificação das AgNORs nos distúrbios de maturação epitelial presentes em leucoplasias da mucosa bucal**. 2005. 47 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, INCA. <http://www.inca.gov.br/estimativas>. Acessado em agosto de 2007.

JOHNSON, N.W. **Risk Markers For Oral Diseases. Volume 2: Oral Cancer. Detection Of Patients And Lesions At Risk**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 400 p.

KAPLAN, I. *et al.* Na immunohistochemical study of p53 and PCNA in inflammatory papillary hyperplasia of the palate: a dilemma of interpretation. **Oral Dis.**, v. 4, p. 194-199, 1998.

KITAURA, H. *et al.* Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-myc and p21^{cip1/waf1/sdi1} in DNA replication and transcription. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 10477-10483, 2000.

KO, L.J.; PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. **Genes Dev.**, v.10, p. 1054-1072, 1996.

KRAMER, I.R.H. *et al.* WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancer. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 46, p. 518-539, 1978.

KRAMER, I.R.H. Precancerous conditions of the oral mucosa: A computer-aided study. **Ann. R. Coll. Surg. Eng.**, v. 45, p. 340-356, 1969.

KUO, M. *et al.* Prognostic role of p21^{WAF1} expression in areca quid chewing and smoking-associated oral squamous cell carcinoma in Taiwan. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 31, p. 16-22, 2002.

KUROKAWA, H. *et al.* Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without dysplasia. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 32, p. 513-521, 2003.

LABAER, J. *et al.* New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. **Genes Dev.**, v.11, p. 847-862, 1997.

LI, R. *et al.* Subcellular distribution of p21^{WAF1} and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. **Cur. Biol.**, v. 6, p. 189-199, 1996.

LIND, P.O. Malignant transformation in oral leukoplakia. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 95, p. 449-455, 1987.

LLEWELYN, J.; MITCHELL, R. Smoking, alcohol and oral cancer in South East Scotland: a 10-year experience. **Br. J. Oral Max. Surg.**, v. 32, p. 146-152, 1994.

LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.79, p. 321-329, 1995.

MACDONALD, D.G.; RENNIE, J.S. *et al.* Oral epithelial atypia in denture induced hyperplasia, lichen planus and squamous cell papilloma. **Int. J. Oral Surg.**, v. 4, p. 40-45, 1975.

MAIER, H. *et al.* Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. **Alcohol. Clin. Exp. Res.**, v. 18, p. 387-391, 1994.

MAO, L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. **Mol. Med. Today**, v. 3, p. 442-448, 1997.

MATEO, M.S. *et al.* Expression of p21^{WAF1/CIP1} in fetal and adult tissues: simultaneous analysis with Ki67 and p53. **J. Clin. Pathol.**, v.50, p. 645-653, 1997.

MATSUMURA, T. *et al.* p53 and MDM2 expression in oral squamous cell carcinoma. **Oncology**, v. 53, p. 308-312, 1996.

MERNE, M. *et al.* Proliferation and differentiation markers in snuff-induced oral mucosal lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 31, p. 259-66, 2002.

MIETTINEN, H.E. *et al.* Cell cycle regulators (p21^{WAF1}, p53, pRb) in oligodendrocytic tumours: a study by novel tumor microarray technique. **J. Neuro-Oncology**, v. 55, p. 29-37, 2001.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2004. 320 p.

MORENO-LÓPEZ, L.A. *et al.* Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 170-174, 2000.

NADAL, A. *et al.* p21^{Waf1/Cip1} expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinomas of the larynx. **J. Pathol.**, v.183, p. 156-163, 1997.

NEMES, J.A; NEMES, Z.; MÁRTON, I.J. p21^{Waf1/Cip1} expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, p. 274-279, 2005.

NEVES, A.C. *et al.* Comparison between immunohistochemical expression of cyclin D1 and p21WAF1 and histological malignancy graduation of oral squamous cell carcinomas. **Braz. Dent. J.**, v. 15, p. 93-98, 2004.

NEVILLE, B.W.; TERRY, A. D. Oral Cancer and Precancerous Lesions. **CA Cancer J. Clin.**, v. 52, p. 195-215, 2002.

NEVILLE, B.W. *et al.* **Patologia Oral e Maxilofacial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 798 p.

NG, I.O.L. *et al.* Expression of p21/waf1 in oral squamous cell carcinomas-correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. **Oral Oncol.**, v. 35, p. 63-69, 1999.

NYLANDER, K.; DABELSTEEN, E.; HALL, P.A. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 29, p. 413-425, 2000.

PARTRIDGE, M. *et al.* New insights into p53 protein stabilisation in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 35, p. 45-55, 1999.

PINDBORG, J.J. *et al.* Studies in oral leukoplakia. Clinical and histologic signs of malignancy. **Acta Odont. Scand.**, v. 21, p.407-414, 1963.

PINDBORG, J.J. *et al.* **Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa**. 2. ed. Berlín: Springer, 1997. 87 p.

PRIVES, C.; HALL, P.A. The p53 pathway. **J. Pathol.**, v.187, p. 112-126, 1999.

RAYBAUD-DIOGÈNE, H. *et al.* p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. **Oral Oncol., Eur. J. Cancer**, v. 32B, p. 143-149, 1996.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 14, p. 47-62, 2003.

ROED-PETERSEN B. Cancer development in oral leukoplakia: Follow-up of 331 patients. **J. Dent. Res.**, v. 50, p. 711, 1971.

ROWLEY, H.; SHERRINGTON, P.; HELLIWELL, T.R. *et al.* p53 expression and p53 gene mutation in oral cancer and dysplasia. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 118, p. 115-123, 1998.

SANTOS-GARCÍA, A. *et al.* Proteic expresión of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakias. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 10, p. 1-8, 2005.

SAVE, V.; NYLANDER, K.; HALL, P.A. Why is p53 protein stabilized in neoplasia? Some answers but many more questions! **J. Pathol.**, v. 184, p. 348-350, 1998.

SCHOELCH, M.L. *et al.* Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 35, p. 333-342, 1999.

SHAFER, W.G. *et al.* Oral carcinoma in situ. **Oral Surg.**, v. 39, p. 227-238, 1975.

SHAFER, W.G.; HINE, M.K.; LEVY, B.M. **Tratado de Patología Bucal**. 4. ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985. 837 p.

SHIN, D.M. *et al.* Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 321-326, 1994.

SHIOHARA, M. *et al.* Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. **Blood**, v. 84, p. 3781-3784, 1994.

SILVERMAN, J.R. Observations on the clinical characteristics and natural history of oral leukoplakia. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 76, p.772-777, 1968.

SILVERMAN, J.R.; GORSKY, M.; LOZADA, F. Oral leukoplakia and malignant transformation: A follow-up study of 257 patients. **Cancer**, v. 53, p. 563-568, 1984.

SILVERMAN, J.R. Leukoplakia and Erythroplasia. In: _____. **Oral Cancer**. 4 ed. Canadá: B C Decker, 1998. Cap. 3, p. 25-40.

TIMOFEEV, O.V.; POSPELOVA, T.V.; POSPELOV, V.A. Functions of p21^{WAF1} in norm and in stress. **Mol. Biol.**, v. 38, p. 309-321, 2004.

van der WAAL, I. *et al.* Oral leukoplakia: a clinicopathological review. **Oral Oncol.**, v. 33, p.291-301, 1997.

VAN OIJEN, M.G.C.T. *et al.* Expression of p21(WAF1/CIP1) in head and neck cancer in relation to proliferation, differentiation, p53 status and cyclin D1 expression. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 27, p.367-75, 1998.

XIE, X.; CLAUSEN, O.P.F.; BOYSEN, M. Prognostic significance of p21^{Waf1/Cip1} expression in tongue squamous cell carcinomas. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 128, p. 897-902, 2002.

XIONG, Y. *et al.* p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature**, v. 366, p. 701-704, 1993.

WALDRON, C.A.; SHAFER, W.G. Leukoplakia revisited: A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. **Cancer**, v. 36, p. 1386-1392, 1975.

WARNAKULASURIYA, K.A.A.S.; TAVASSON, M.; JOHNSON, N.W. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 27, p.376-381, 1998.

WEINBERG, W.C.; DENNING, M.F. p21^{WAF1} control of epithelial cell cycle and cell fate. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 13, p. 453-464, 2002.

WEITZMAN, S.A. *et al.* Phagocytes as carcinogens: malignant transformation produced by human neutrophils. **Science**, v. 227, p.1231–1233,1985.

WHYTE, D.A.; BROTON, C.E.; SHILLITOE, E.J. The unexplained survival of cells in oral cancer: what is the role of p53? **J. Oral Pathol. Med.**, v. 31, p. 125-33, 2002.

WIGHT, A.J.; OGDEN, G.R. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer-a review. **Oral Oncol.**, v. 34, p. 441-447, 1998.

YOOK, J.I.; KIM, J. Expression of p21WAF1/CIP1 is unrelated to p53 tumor suppressor gene status in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, v. 34, p. 198-203, 1998.

YOSHIMURA, A. Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. **Cancer Sci.**, v. 97, p. 439-447, 2006.

ZAVRAS, A.I. *et al.* Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece. **Oral Oncol.**, v. 37, p. 28-35, 2001.

ZHANG, H.; HANNON, G.J.; BEACH, D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. **Genes e Dev.**, v. 8, p. 1750-1758, 1994.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS p53 E p21^{WAF1} NAS DIFERENTES ALTERAÇÕES EPITELIAIS PRESENTES EM LEUCOPLASIAS DA MUCOSA BUCAL

F. Visioli¹, I.S. Lauxen¹, P.V. Rados¹

¹ *Departamento de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.*

Palavras-Chave: Leucoplasia, displasia epitelial, acantose, hiperkeratose, p53, p21^{WAF1}

INTRODUÇÃO

Leucoplasia é a lesão cancerizável mais freqüente da mucosa bucal. A OMS (1978) a define como 'uma placa ou mancha branca, não removida por raspagem e, que não pode ser caracterizada clínica ou histopatologicamente como nenhuma outra lesão'.¹⁻⁴ Leucoplasia é um diagnóstico clínico e, portanto, não apresenta nenhuma conotação histopatológica. Microscopicamente é diagnosticada de acordo com a alteração epitelial presente.^{2,3,5}

A taxa de transformação maligna de leucoplasias varia entre 3,6 a 17,5% na literatura.⁶⁻¹⁴ Quando evidência histológica de displasia epitelial está presente, o risco aumenta para 36%, portanto, a presença de displasia epitelial é considerada o fator preditor mais importante na determinação do risco de transformação maligna de lesões cancerizáveis.^{1,12,15} No entanto, muitos carcinomas espinocelulares de boca se desenvolvem a partir de leucoplasias sem displasia epitelial.^{12,16,17} Os estudos que avaliam o risco de transformação maligna restringem seu foco na presença ou ausência de displasia epitelial, sem dar maior atenção às demais alterações epiteliais presentes nas leucoplasias bucais. Foi demonstrado que leucoplasias com acantose, hiperkeratose ou com acantose em associação a hiperkeratose apresentam alteração no ritmo de proliferação celular, observado

através da técnica de AgNOR, sendo que a acantose apresentou resultados semelhantes à displasia epitelial, pois alteração no ritmo de proliferação foi vista tanto na camada basal quanto suprabasal.¹⁸

Os processos de proliferação, diferenciação e senescência estão intimamente relacionados com a regulação do ciclo celular. Alteração da maquinaria que regula o ciclo celular pode desencadear a progressão para a neoplasia maligna.¹⁹ Mutações no gene *TP53* são as alterações genéticas mais encontradas no câncer, ocorrendo em aproximadamente 70-75% de todos os tumores humanos¹⁷, e em 40-50% no câncer bucal.²⁰

A p53 é uma das principais proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, sua função é a de bloquear o ciclo no ponto de restrição na presença de DNA danificado, a fim de que este possa ser reparado antes de ser duplicado. Se o dano persiste ou não pode ser reparado, a p53 desencadeia a morte celular por apoptose.^{17,21-23} Na célula é encontrada em baixas concentrações, pois apresenta uma meia-vida curta de, aproximadamente, 20 minutos. Contudo, em lesões cancerizáveis e no câncer bucal existe um aumento da sua expressão imunohistoquímica, sugerindo que alterações na expressão de p53 ocorram em estágios iniciais da carcinogênese bucal.²⁴⁻²⁷

Para bloquear o ciclo celular a p53 estimula a transcrição da proteína p21^{WAF1}, que é codificada pelo gene *WAF-1*.²⁸ A p21^{WAF1} forma um complexo quaternário com ciclina, cdk e com PCNA, assim evita a fosforilação da proteína pRb pelo complexo ativo ciclina/cdk, inibindo a progressão do ciclo celular de G1 para a fase S.^{29,30} Pode também, quando ligada ao antígeno nuclear da célula em proliferação (PCNA), inibir diretamente a replicação do DNA na fase S.^{31,32} Sua expressão imunohistoquímica também é alterada durante o processo de carcinogênese bucal, aumenta em número e intensidade com a progressão da severidade do quadro histológico. Assim, a alteração na expressão de p21^{WAF1} pode ser um evento que contribui ou então, reflete a carcinogênese no epitélio bucal.³³⁻⁴⁰

Este trabalho se propõe avaliar a expressão imunohistoquímica das proteínas reguladoras do ciclo celular, p53 e p21^{WAF1}, em leucoplasias bucais, com diferentes alterações epiteliais: acantose, hiperqueratose, acantose em associação com hiperqueratose e displasia epitelial.

METODOLOGIA

Seleção e Preparo das Amostras

A amostra utilizada é proveniente do arquivo do Laboratório de Histopatologia “Prof. Dr. J.J. Barbachan” do setor de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brasil) e, foi selecionada a partir de um estudo anterior desenvolvido no mesmo laboratório¹⁸. Consistia de 40 lesões com diagnóstico clínico de leucoplasia, fixadas em formalina e incluídas em parafina, distribuídas em 4 grupos conforme o diagnóstico histopatológico: 10 casos de displasia epitelial, 10 casos de acantose, 10 casos de hiperqueratose e 10 casos de acantose associada a hiperqueratose. A partir dos novos cortes realizados os diagnósticos histopatológicos foram confirmados e classificados baseados nas características especificadas na literatura.^{41,42} Do total de 40 amostras pré-selecionadas, 4 foram descartadas por apresentarem material insuficiente e 9 amostras tiveram o diagnóstico histopatológico alterado. A amostra resultante ficou distribuída da seguinte forma: 11 casos de displasia epitelial, 6 acantoses, 9 hiperqueratoses e 10 acantoses associadas a hiperqueratose.

De cada uma das amostras foram feitos 2 cortes de 3µm (micrótomo LEICA – modelo RM 2155). Os cortes foram desparafinizados em xileno e rehidratados em álcool. Para o bloqueio da peroxidase endógena os cortes foram imersos em metanol com 0,3% de peróxido de hidrogênio. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão citrato de pH 6.0 (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) em uma panela a vapor durante 20 minutos. Em seguida as amostras resfriavam até a temperatura ambiente imersas na solução citrato tampão. Após as lâminas eram encubadas na estufa a 30°C durante 1 hora com o anticorpo primário. O anticorpo p53 (Clone DO-7, Monoclonal Mouse, Anti-humano, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) foi utilizado na diluição 1:50 e o anticorpo p21^{WAF1} (Clone SX118, Monoclonal Mouse, Anti-humano, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) foi utilizado na diluição 1:30. Para detecção imunohistoquímica foi utilizado o sistema EnVision+® (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA), durante 45 minutos em estufa a 30°C. Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris e montados com Entellan® (Merck KgaA, Damstadt, Alemanha).

O controle negativo consistiu na supressão do anticorpo primário. Para controle positivo do anticorpo p21^{WAF1} foi utilizado uma amostra de amígdala e para p53 uma amostra de carcinoma espinocelular bucal que, após teste prévio, apresentava marcação imunoistoquímica positiva para esta proteína.

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética e pela comissão de pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ANEXO).

Análise Quantitativa e Qualitativa

Foram selecionadas e capturadas imagens das lâminas, no aumento de 200x, através de uma câmara de vídeo Olympus[®] (modelo Qcolor 5, Coolet, RTV) acoplada a um microscópio binocular Olympus Optical Co. modelo CX41RF e a um computador Dell[®] (modelo Dimension 5150). Para cada lâmina foram capturados, utilizando o software Qcapture[®] (versão 2.81; Quantitative Imaging Corporation, Inc.; 2005), 5 campos que eram característicos da alteração epitelial avaliada. A análise e quantificação foram realizadas por um único observador, cego, pois os campos foram codificados.

Utilizando a ferramenta de contagem manual do software ImageTool[®] para Windows versão 3.0 (UTHSCSA-University of Texas Health Science Center in San Antonio) foram quantificadas 500 células da camada basal e 500 da camada suprabasal, determinando a porcentagem de células marcadas positivamente pela técnica imunoistoquímica. Foram consideradas positivas as células com núcleo corado de marrom.

Foi realizada, também, uma análise qualitativa, onde se determinou a presença ou ausência de marcação imunoistoquímica nas camadas intermediárias e descamativa. A camada basal foi considerada a camada logo acima da membrana basal, a camada suprabasal consistia de 2 estratos celulares logo acima da camada basal. A camada descamativa era composta pelas células mais superficiais e que apresentavam morfologia achatada. A camada intermediária consistia das células epiteliais presentes entre a camada suprabasal e a camada descamativa⁴³.

O infiltrado inflamatório adjacente ao tecido epitelial foi classificado em ausente, predominantemente linfocitário, ou com presença equivalente de linfócitos e polimorfonuclear neutrófilos.

Calibragem

No decorrer da análise, a cada 10 campos analisados, um foi sorteado para ser re-analisado. Para avaliação da calibragem intraexaminador, as variáveis quantitativas foram analisadas através do Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC=0,996 para camada basal e ICC=0,994 para camada suprabasal) e as variáveis qualitativas foram analisadas através do teste Kappa (k=1) sendo que, não houve diferença estatisticamente significativa entre as leituras.

Análise Estatística

Para análise dos resultados, utilizando o software SPSS 11.0 versão para Windows, a comparação entre os grupos foi realizada com o teste ANOVA ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para avaliar associação entre os marcadores, p53 e p21^{WAF1}, foi utilizada a Correlação de Pearson.

RESULTADOS

Todas as amostras apresentaram marcação positiva para a técnica imunohistoquímica das proteínas p53 e p21^{WAF1}. A marcação positiva, para ambas as proteínas, foi observada como coloração marrom do núcleo das células epiteliais (Figuras 1, 2, 3 e 4).

A marcação de p53 na camada basal e suprabasal foi semelhante, variando entre 42 a 54%, nos 4 grupos. No entanto, a marcação de p21^{WAF1} diferiu entre as camadas, na basal houve marcação de 3 e 4% das células, enquanto que na suprabasal a marcação ocorreu entre 16 a 28% das células epiteliais dos 4 grupos estudados (Tabelas 1 e 2).

A comparação entre a média e a porcentagem média de células positivas nas camadas basal e suprabasal, para os marcadores p53 e p21^{WAF1}, não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabelas 1 e 2). As tabelas 3 e 4 apresentam a quantidade de amostras com marcação positiva nas células das camadas intermediária e descamativa. A p53 apresentou marcação positiva na camada intermediária em 100% das amostras. Na camada descamativa houve menos marcação no grupo displasia (27%) e a maior marcação foi vista no grupo de acantose associada a hiperqueratose (70%).

Apesar de os testes estatísticos aplicados não indicarem diferenças significativas, observa-se uma tendência de aumento da expressão de p21^{WAF1} na camada suprabasal. O grupo displasia apresentou a maior média de células positivas seguido do grupo acantose, acantose associada a hiperqueratose e hiperqueratose. Na camada intermediária 100% das displasias apresentavam marcação positiva, enquanto que 83% das acantoses, 90% das acantoses com hiperqueratoses e 77% das hiperqueratoses apresentaram células p21^{WAF1} positivas na camada intermediária.

Através do Coeficiente de Correlação de Pearson, verifica-se uma correlação significativa, direta, fraca, entre p53 e p21^{WAF1} nas células da camada basal. Quanto maior a quantidade de células positivas para p53 maior a quantidade de células positivas para p21^{WAF1} (Tabela 5).

Em 91,7% das amostras havia infiltrado inflamatório subjacente ao tecido epitelial, sendo que na maioria das vezes o infiltrado era predominantemente linfocitário (Tabelas 6 e 7).

Tabela 1. Distribuição das médias, porcentagens médias de células p53 positivas e erro-padrão (\pm EP) entre os grupos, nas camadas basal e suprabasal.

Grupos	Média p53 \pm EP	%Média \pm EP	P
CAMADA BASAL			
Displasia Epitelial	224,36 \pm 30,37	44,87 \pm 6,07	0,790
Acantose	214,50 \pm 58,91	42,90 \pm 11,78	
Hiperkeratose	238,22 \pm 42,81	47,64 \pm 8,56	
Acantose c/ Hiperkeratose	267,50 \pm 31,88	53,50 \pm 6,38	
CAMADA SUPRABASAL			
Displasia Epitelial	263,64 \pm 31,80	52,73 \pm 6,36	0,951
Acantose	236,67 \pm 57,47	47,33 \pm 11,49	
Hiperkeratose	267,78 \pm 42,48	53,56 \pm 8,50	
Acantose c/ Hiperkeratose	269,20 \pm 32,68	53,84 \pm 6,54	

Tabela 2. Distribuição das médias, porcentagens médias de células p21^{WAF1} positivas e erro-padrão (\pm EP) entre os grupos, nas camadas basal e suprabasal.

Grupos	Média p21 ^{WAF1} \pm EP	%Média \pm EP	p
CAMADA BASAL			
Displasia Epitelial	24,64 \pm 6,51	4,93 \pm 1,30	0,960
Acantose	22,33 \pm 8,73	4,47 \pm 1,75	
Hiperkeratose	21,11 \pm 9,70	4,22 \pm 1,94	
Acantose c/ Hiperkeratose	19,60 \pm 4,06	3,92 \pm 0,81	
CAMADA SUPRABASAL			
Displasia Epitelial	138,82 \pm 18,64	27,76 \pm 3,73	0,165
Acantose	132,67 \pm 24,33	26,53 \pm 4,87	
Hiperkeratose	82,00 \pm 18,92	16,40 \pm 3,78	
Acantose c/ Hiperkeratose	104,60 \pm 18,23	20,92 \pm 3,65	

Tabela 3. Distribuição das amostras que apresentam marcação positiva para p53 nas camadas intermediária e descamativa.

Grupos	n total	p53	
		Intermediária +	Descamativa +
Displasia Epitelial	11	11(100%)	3(27%)
Acantose	6	6(100%)	4(66%)
Hiperkeratose	9	9(100%)	5(55%)
Acantose c/ Hiperkeratose	10	10(100%)	7(70%)

Tabela 4. Distribuição das amostras que apresentam marcação positiva para p21^{WAF1} nas camadas intermediária e descamativa.

Grupos	n total	p21 ^{WAF1}	
		Intermediária +	Descamativa +
Displasia Epitelial	11	11(100%)	0(0%)
Acantose	6	5(83%)	0(0%)
Hiperkeratose	9	7(77%)	3(33%)
Acantose c/ Hiperkeratose	10	9(90%)	1(10%)

Tabela 5. Resultados da Correlação de Pearson entre os marcadores p53 e p21^{WAF1} nas camadas basal e suprabasal.

Localização	R
Camada Basal	0,361*
Camada Suprabasal	0,250

* correlação significativa, direta fraca, entre p53 e p21^{WAF1}.

Tabela 6. Distribuição e tipo de infiltrado inflamatório nos diferentes grupos nas amostras de p53.

Grupos	n total	Ausente	Linfocitário	Linfócito +Neutrófilo
Displasia Epitelial	11	0 (0%)	11(100%)	0(0%)
Acantose	6	0(0%)	3(50%)	3(50%)
Hiperkeratose	9	3(33%)	4(44%)	2(22%)
Acantose c/ Hiperkeratose	10	0(0%)	7(70%)	3(30%)

Tabela 7. Distribuição e tipo de infiltrado inflamatório nos diferentes grupos nas amostras de p21^{WAF1}.

Grupos	n total	Ausente	Linfocitário	Linfócito +Neutrófilo
Displasia Epitelial	11	1(9%)	9(81%)	1(9%)
Acantose	6	0(0%)	5(83%)	1(16%)
Hiperkeratose	9	1(11%)	5(55%)	3(33%)
Acantose c/ Hiperkeratose	10	1(10%)	6(60%)	3(30%)

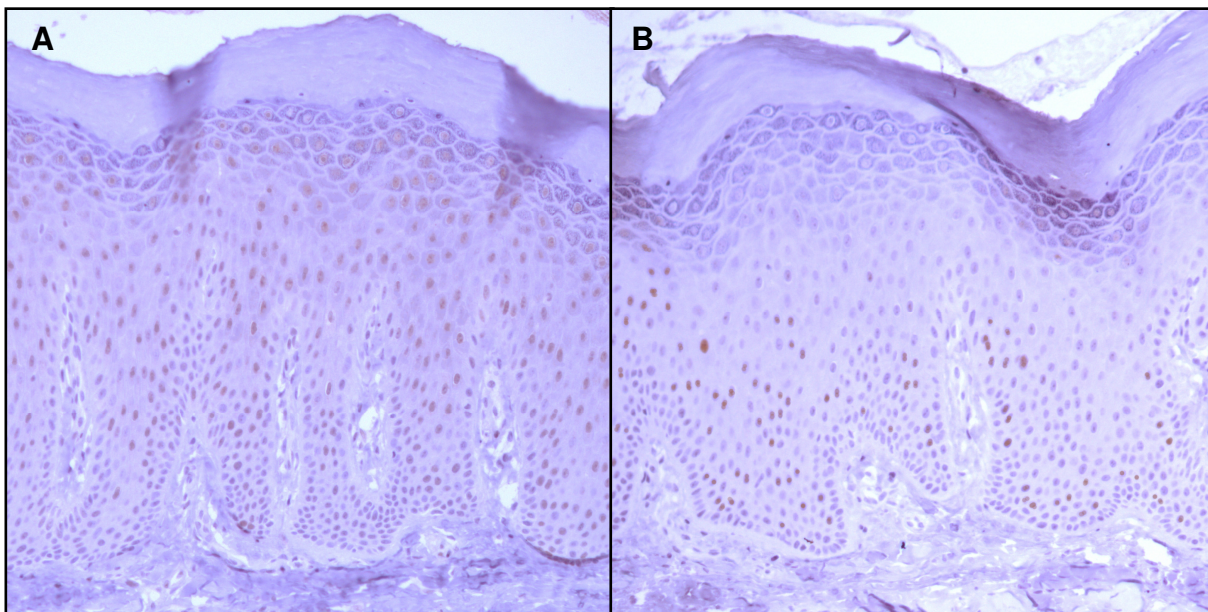


Figura 1. Fotomicrografias de leucoplasias com hiperkeratose. A, marcação imunoistoquímica de p53. B, marcação imunoistoquímica de p21^{WAF1}. Aumento 200x.

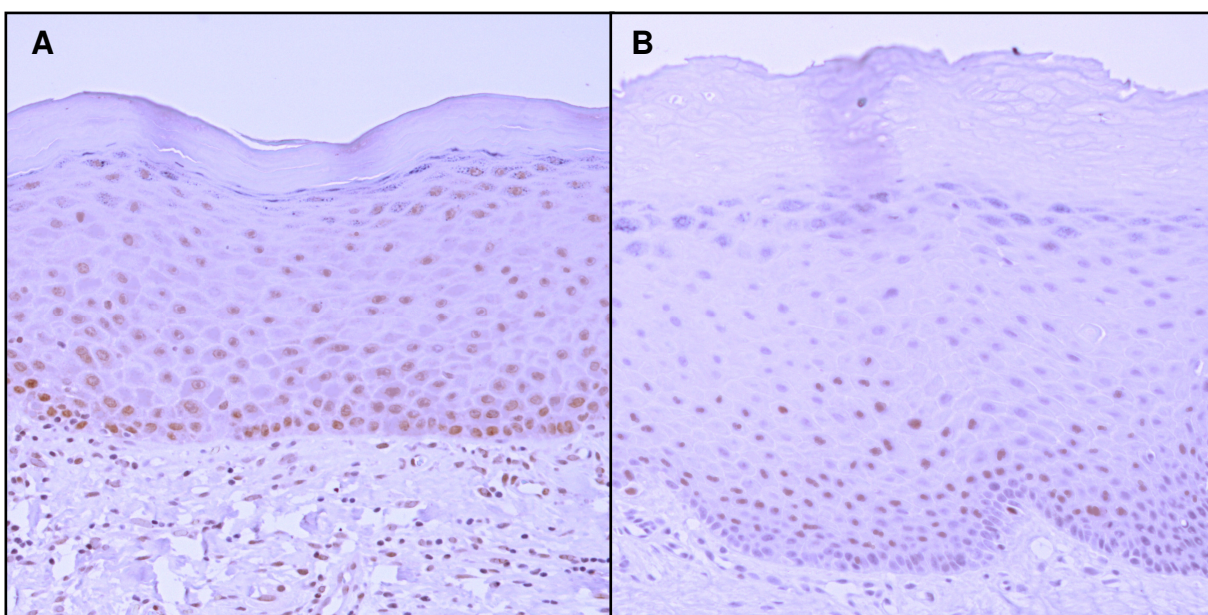


Figura 2. Fotomicrografias de leucoplasias com acantose associada a hiperkeratose. A, marcação imunoistoquímica de p53. B, marcação imunoistoquímica de p21^{WAF1}. Aumento 200x.

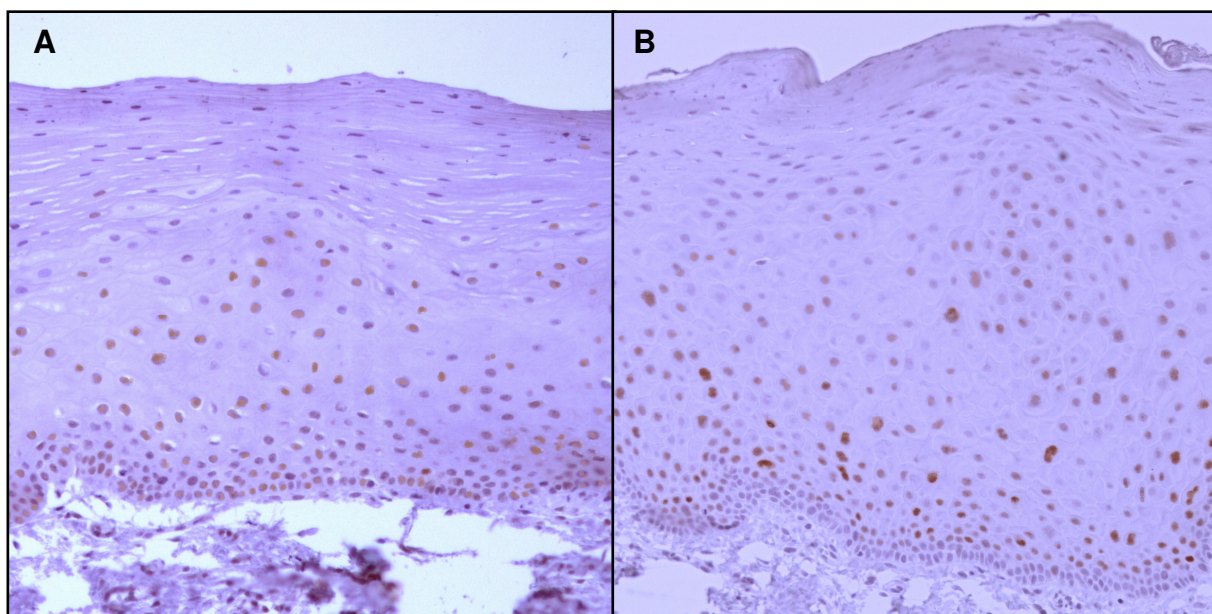


Figura 3. Fotomicrografias de leucoplasias com acantose. A, marcação imunoistoquímica de p53. B, marcação imunoistoquímica de p21^{WAF1}. Aumento 200x.

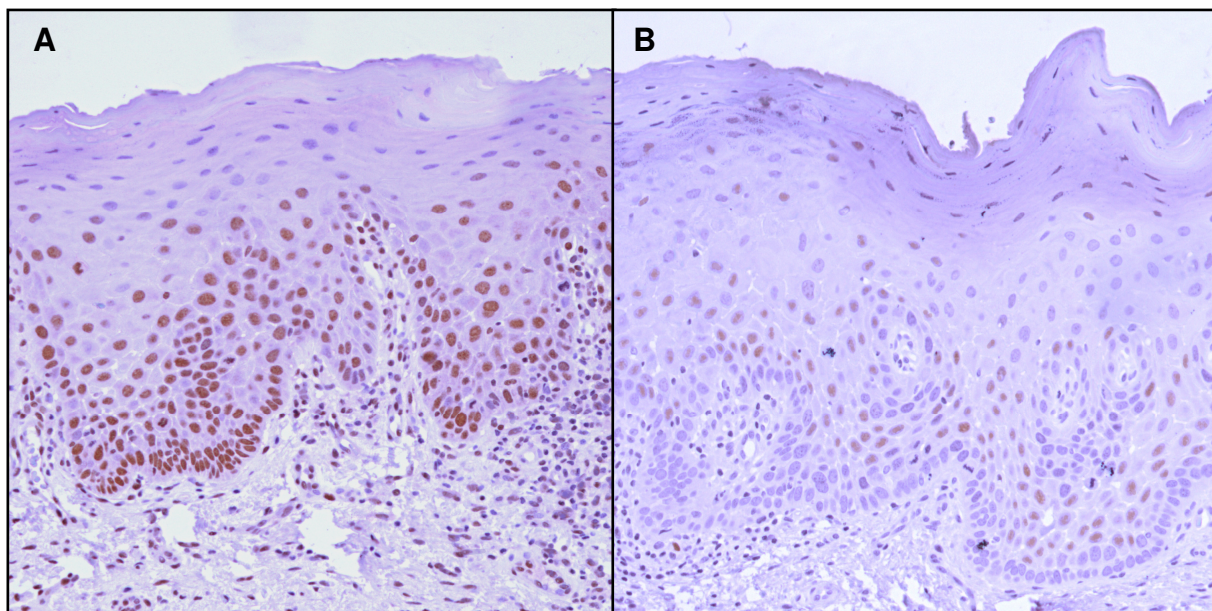


Figura 4. Fotomicrografias de leucoplasias com displasia epitelial. A, marcação imunoistoquímica de p53. B, marcação imunoistoquímica de p21^{WAF1}. Aumento 200x.

DISCUSSÃO

Apesar de a presença histopatológica de displasia epitelial ainda ser considerada a maior preditora de risco de progressão para carcinoma espinocelular, uma quantidade considerável de leucoplasias sem displasia epitelial também sofrem transformação maligna.^{1,12,15-17} Faltam estudos na literatura que avaliem e comparem o comportamento das demais alterações epiteliais, presentes nas leucoplasias bucais, diferentes da displasia epitelial.

Mutações no gene e alteração da expressão da proteína p53 estão, freqüentemente, presentes nas lesões cancerizáveis e nos carcinomas espinocelulares bucais.^{20,22,25-27,37,44} Os resultados do nosso estudo mostram que em todas as alterações epiteliais estudadas a expressão imunoistoquímica da proteína p53 está alterada. Apesar de não ter sido incluído no estudo amostras controle de epitélio morfologicamente normal, a literatura relata que em um quadro de normalidade a expressão de p53 deveria ser restrita a algumas poucas células da camada basal do epitélio. Encontrou-se grande quantidade de células marcadas imunoistoquimicamente (Tabela 1), tanto na camada basal quanto na suprabasal em todas as amostras, sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Além do que, 100% das amostras apresentavam marcação na camada intermediária. Portanto, nossos achados diferem da literatura onde se constata que a expressão imunoistoquímica da p53 sofreria um aumento gradual, em quantidade de células e, de camadas mais inferiores para as mais superiores do epitélio, em função da progressão da severidade, de um epitélio sem alterações para displasia epitelial leve, moderada a severa e para carcinoma espinocelular.^{20,24,26,45}

A maioria dos trabalhos ressaltam, principalmente, o aumento da expressão imunoistoquímica de p53 com a progressão da severidade da displasia epitelial de leve, moderada a severa. Em nosso estudo não foi feita a graduação das amostras de displasia, pois muitos estudos salientam a dificuldade para um consenso diagnóstico, devido a subjetividade de graduação em displasia epitelial.^{46,47}

Os resultados dos estudos imunoistoquímicos sobre p53 variam consideravelmente, dificultando a comparação com nossos achados. A metodologia de avaliação da expressão imunoistoquímica difere entre os trabalhos, sendo que alguns fazem uma análise quantitativa, porém sem diferenciar as camadas epiteliais,

ou então, realizam uma análise semiquantitativa, onde um percentual de células marcadas é estimado e, muitas vezes, a intensidade da marcação também é considerada. Além disso, o uso de diferentes anticorpos monoclonais ou policlonais, pode apresentar diferentes padrões de marcação. Análises imunoistoquímicas podem ser influenciadas ainda, por outros fatores tais como: concentração utilizada do anticorpo, os efeitos dos diferentes protocolos de recuperação antigênica, a sensibilidade do sistema de detecção utilizado e a fixação do tecido analisado.^{20, 25-27, 37, 44, 48, 49}

Existe, na literatura, uma forte correlação entre expressão imunoistoquímica da proteína p53 e mutação no gene *TP53*, pois a p53 apresenta uma meia vida muito curta (aproximadamente 20 minutos), enquanto que a proteína mutante, usualmente, possui uma meia vida aumentada, tornando-a mais facilmente detectada pela técnica imunoistoquímica.^{20,22,45,48,50} Entretanto, em certas condições, a proteína normal pode ser retida no tecido, sendo assim detectada imunoistoquimicamente, através da ligação a outras proteínas ou devido a algum defeito no seu processo de degradação, que está relacionado à proteína mdm2^{20,50,51} Sabe-se também, que estabilização e detecção imunoistoquímica de p53 pode ocorrer em função de diferentes agressões celulares, como irradiação ultravioleta e exposição a carcinógenos.^{48,52,53} Assim nestas situações p53 é detectável porque as células estão em permanente estágio de dano ao DNA.

Ainda não está determinado se o aumento da expressão de p53 em lesões cancerizáveis é resultado de uma mutação ou se representa uma resposta celular frente à exposição crônica a carcinógenos.⁴⁸ O anticorpo monoclonal clone DO-7 usado em nosso estudo reconhece ambas as proteínas, portanto, não há como distinguir proteína normal de mutante nos tecidos avaliados.^{24,51} Pillai *et al.* (2003)⁵¹ realizaram um estudo que comparava o uso de dois anticorpos diferentes e observaram que o anticorpo DO-7, em comparação ao 1801, detectou maior expressão de p53 normal, houve mais marcação imunoistoquímica em tecidos adultos sem alterações. Possivelmente esta alta sensibilidade do anticorpo explicaria a elevada marcação observada neste estudo.

Em nosso estudo a expressão imunoistoquímica de p53 no epitélio pode indicar que o sistema p53 está funcionando corretamente e está ativo em células sob estresse, que podem a partir daquele momento, reparar o dano ou entrar em apoptose. A amostra utilizada em nosso estudo é proveniente de arquivo, os dados

referentes ao consumo de substâncias carcinogênicas, como o fumo e álcool, fatores importantes envolvidos na etiologia e no prognóstico das lesões cancerizáveis, deixaram de ser informados nas fichas de biópsia enviadas com o material. O uso crônico de fumo e álcool, nas nossas amostras, poderiam ser responsáveis por manter as células epiteliais em constante dano genético e determinar alta expressão imunoistoquímica da p53.

Field, Spandidos e Stell (1992)⁵⁴ avaliando a expressão imunoistoquímica de p53 em câncer de cabeça e pescoço, observaram que 6 de 7 não-fumantes não expressaram p53, enquanto que 29 de 37 fumantes apresentaram aumento da expressão de p53.

Uma explicação alternativa para a marcação tão evidente da p53 seria a possibilidade de que os danos genéticos que levariam progressivamente ao câncer bucal já estão presentes em distúrbios epiteliais considerados morfologicamente inocentes. Lavieille et al. (1998)⁵⁵ relatam que mutações em *TP53* ocorrem precocemente em carcinomas de cabeça e pescoço. Em seu estudo verificaram que em 79% da sua amostra não-tumoral havia mutação genética em *TP53*, sendo 4 de 5 amostras de mucosa normal exposta a fumo e álcool, 7 de 10 hiperplasias epiteliais e em 4 de 4 displasias.

A proteína p21^{WAF1} é a principal responsável por promover a pausa do ciclo celular para que o DNA danificado possa ser reparado. Apesar de atuar no controle da proliferação celular, apresenta funções que podem favorecer o processo de carcinogênese, pois atua como uma proteína adaptadora de complexos ciclina/cdk ativos e em determinados momentos é antiapoptótica.^{29,30, 37, 56-61}

Marcação imunoistoquímica da p21^{WAF1}, em nosso estudo, foi observada principalmente na camada suprabasal do epitélio, com células positivas isoladas na camada basal, concordando com os achados de muitos estudos.^{36,38,39,59,62,63} A literatura relata que com a progressão histológica de displasia leve a moderada, severa e a carcinoma espinocelular a expressão da p21^{WAF1} aumenta em número de células positivas e passa de restrita a camada suprabasal a todas as camadas epiteliais.^{33,34,36,38,40,64,65} Em nossos achados, apesar de não haver diferença estatisticamente significativa, a maior quantidade de células positivas foi vista no grupo displasia, seguido do grupo acantose, acantose associada a hiperqueratose e hiperqueratose. Além disso, 100% das displasias apresentavam marcação positiva na camada intermediária, enquanto que 83% das acantoses, 90% das acantoses com

hiperkeratoses e 77% das hiperkeratoses apresentaram células p21^{WAF1} positivas na camada intermediária.

Se a expressão de p21^{WAF1} aumenta em consequência da progressão da severidade da alteração epitelial, nossos achados sugerem que, dentre as alterações epiteliais em leucoplasias sem displasia epitelial, a presença de acantose pode representar uma alteração mais severa e, conseqüentemente, determinar maior risco de transformação maligna da lesão cancerizável quando presente. A acantose se caracteriza por um espessamento da camada intermediária do epitélio⁴², dessa forma a maior expressão imunohistoquímica de p21^{WAF1} nas camadas suprabasal e intermediária observada em nossos resultados, pode indicar que esse espessamento epitelial ocorra à custa de alterações na proliferação celular destas camadas.

Ainda não foi elucidado porque ocorre esse aumento de p21^{WAF1} associado com o aumento da severidade da alteração epitelial. Poderia representar uma tentativa celular de controle proliferativo, mas que possivelmente é superado por outros fatores que promovem a carcinogênese e que se sobressaem a função inibitória de p21^{WAF1}. Alternativamente, a p21^{WAF1} detectada poderia estar exercendo funções que favorecem a proliferação celular.^{28,30,34,37,59,66,67} A função inibitória de p21^{WAF1} é regulada estequiometricamente, múltiplas moléculas de p21^{WAF1} são necessárias para inibir um complexo ciclina-cdk, enquanto que apenas uma molécula funciona como um fator que favorece a ligação do complexo ciclina-cdk, sendo que este é ativo.^{59,61} No entanto, provavelmente, em ambas as situações poderá haver detecção imunohistoquímica.

Encontrou-se uma correlação positiva entre a expressão de p53 e p21^{WAF1}, contrariando muitos trabalhos que não verificaram essa associação e suportam que mecanismos independentes da ação de p53 estão envolvidos com a indução da expressão de p21^{WAF1} nas lesões cancerizáveis e no câncer bucal.^{33-36,39,62,63,68,69} Indução de p21^{WAF1} independente de p53 acontece, principalmente, em resposta a estímulos de diferenciação celular enquanto que a indução dependente de p53 ocorreria em resposta a agressões celulares, na presença de dano ao DNA.⁷⁰ A correlação positiva entre a expressão de p53 e p21^{WAF1} reforça a hipótese de que a expressão de p53 em nossas amostras está associada a um sistema p53 funcionando em células que apresentam dano no DNA, pois nessa situação p53 induz a expressão de p21^{WAF1} para que ocorra o bloqueio do ciclo celular.

A constatação de que a expressão imunohistoquímica de p53 e p21^{WAF1} está alterada em lesões cancerizáveis com diferentes alterações epiteliais, corrobora a afirmação de que alteração no padrão de expressão dessas proteínas reguladoras do ciclo celular é um evento precoce na carcinogênese bucal.³⁷

Nossos achados em que novos cortes histológicos de leucoplasias resultaram em mudança de diagnóstico histopatológico concordam com outros autores que demonstraram que a lesão apresenta variação no padrão microscópico e que, conseqüentemente, a biópsia incisional isoladamente pode não ser considerada representativa.^{15,71}

A exposição da superfície epitelial do trato aerodigestivo superior a carcinógenos, determina a presença de um campo de cancerização. Uma população de células geneticamente alteradas, gradualmente, dará origem a um campo que é suscetível a novos danos genéticos. Este campo, apesar de não detectável macroscopicamente, é fértil para o surgimento de lesões cancerizáveis e lesões malignas. Várias alterações morfológicas e genéticas distintas podem ser identificadas em diferentes regiões do epitélio bucal dentro do campo de cancerização.^{3,72,73} Assim como no campo de cancerização, verificamos que dentro de uma mesma lesão cancerizável as alterações epiteliais podem variar em diferentes campos.

Horta *et al.* (2007)⁷⁴ observaram que a expressão imunohistoquímica de p53 e p21^{WAF1} em carcinomas espinocelulares de lábio inferior é maior no fronte de invasão do que no tumor como um todo. Considerando que o fronte de invasão é o local que apresenta maior alteração e que determina o comportamento tumoral, sugerem que alteração nestas proteínas reguladoras do ciclo celular favorecem a instabilidade genética levando a um acúmulo de alterações genéticas críticas.

A homeostase celular e tecidual depende de um controle preciso de diferentes sinalizações que levam a proliferação, diferenciação, apoptose e senescência. Esses processos biológicos estão intimamente relacionados com a regulação do ciclo celular. Alterações na função de p53 e p21^{WAF1}, proteínas-chave desse controle, podem favorecer o surgimento de outras alterações e desencadear o processo de múltiplos passos da carcinogênese.^{19,37}

Hildebrand (2005)¹⁸ demonstrou que o ritmo de proliferação celular epitelial está alterado nas leucoplasias sem displasia epitelial. O somatório destas alterações, tanto no controle do ciclo celular, como no ritmo de proliferação celular,

podem com o passar do tempo favorecer a fase final da carcinogênese, a progressão.

Em nossa opinião as expressões imunohistoquímicas de p53 e p21^{WAF1} observadas confirmam que nas leucoplasias sem displasia epitelial já existem alterações no controle da proliferação celular e o aumento da expressão representa um aumento da severidade do dano.

Infiltrado inflamatório subjacente ao tecido epitelial estava presente em mais de 90% das amostras, sendo que esse infiltrado era predominantemente linfocitário. Sua presença pode sugerir uma resposta do organismo, pela atuação do sistema imune denominada vigilância imunológica que visa reconhecer e eliminar células transformadas.⁷⁵ O infiltrado inflamatório pode, porém, estar presente, em razão de outros fatores como presença de áreas ulceradas próximas às áreas analisadas ou devido à infecção fúngica por *Candida albicans*. A presença de *Candida albicans*, fungo relativamente comum na boca, tem sido relatada com freqüência em associação com a leucoplasia.^{76,77} Roed-Petersen, Renstrup e Pindborg (1970)⁷⁸ verificaram que 31% dos espécimes de biópsia de leucoplasias continham *Cândida*.

Sabe-se que a presença do processo inflamatório subjacente pode causar alterações no padrão de proliferação celular epitelial.¹⁷ Em nosso estudo a presença de infiltrado inflamatório foi praticamente constante independentemente do tipo de distúrbio de maturação epitelial observado não sendo possível averiguar uma associação entre o processo inflamatório presente e uma maior ou menor expressão imunohistoquímica de p53 e p21^{WAF1}. Uma análise quantitativa poderia demonstrar se há diferença da intensidade e qualidade de resposta imunológica nos diferentes distúrbios e indicar se há influência deste processo inflamatório na expressão imunohistoquímica.

Os resultados encontrados demonstram que a expressão imunohistoquímica da p53, apesar de elevada, não guarda relação direta com o agravamento do distúrbio de alteração epitelial da leucoplasia, sua expressão parece estar condicionada a presença de uma agressão celular crônica. Todavia, o aumento da expressão imunohistoquímica de p21^{WAF1} verificado na acantose poderia ser interpretado como uma alteração epitelial mais severa do que a hiperqueratose e, dessa forma, merecer maior atenção e controle mais rígido nas leucoplasias onde esta estivesse presente.

AGRADECIMENTOS

Esse estudo foi financiado pela FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul; Edital PROAP 04/2005, Processo 0410882) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

REFERÊNCIAS

1. Kramer IR, Pindborg JJ, Lucas RB, Sobin LH. WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: An aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978; 46: 518-539.
2. van der Waal I, Schepman P, van der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol* 1997; 33: 291-301.
3. Mao L. Leukoplakia: molecular understanding of pre-malignant lesions and implications for clinical management. *Mol Med Today* 1997; 3: 442-448.
4. Silverman JR. Leukoplakia and Erythroplasia. In: Silverman JR. Oral Cancer. Canadá: B C Decker, 1998. p. 25-40.
5. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited: A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. *Cancer* 1975; 36: 1386-1392.
6. Pindborg JJ. Studies in oral leukoplakia.V. Clinical and histologic signs of malignancy. *Acta Odont Scand* 1963; 21: p. 407-414.
7. Einhorn J, Wersäll J. Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of the oral mucosa. *Cancer* 1967; 20: 2189-2193.
8. Silverman JR. Observations on the clinical characteristics and natural history of oral leukoplakia. *JADA* 1968; 76: 772-777.
9. Kramer IRH. Precancerous conditions of the oral mucosa: A computer-aided study. *Ann R Coll Surg Eng* 1969; 45: 340-356.
10. Roed-Petersen B. Cancer development in oral leukoplakia: Follow-up of 331 patients. *J Dent Res* 1971; 50: 711.
11. Bánóczy J. Follow-up studies in oral leukoplakia. *J Maxillofac Surg* 1977; 5: 69-75.
12. Silverman JR, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation: A follow- up study of 257 patients. *Cancer* 1984; 53: 563-568.
13. Lind PO. Malignant transformation in oral leukoplakia. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 449-455.
14. Bouquot JE, Whitaker SB. Oral leukoplakia - Rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or "phases". *Quintessence Int* 1994; 25: 133-140.

15. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 79: 321-329.
16. Subdø J, Ried T, Bryne M, Kildal W, Danielsen H, Reith A. Abnormal DNA content predicts the occurrence of carcinomas in non-dysplastic oral white patches. *Oral Oncol* 2001; 37: 558-565.
17. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14: 47-62.
18. Hildebrand LC. Quantificação das AgNORs nos distúrbios de maturação epitelial presentes em leucoplasias da mucosa bucal. 2005. 47 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
19. Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y. et al. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 51-61.
20. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 413-425.
21. Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; 10: 1054-1072.
22. Raybaud-Diogène H, Tétu B, Morency R, Fortin A, Monteil RA. p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1996; 32B: 143-149.
23. Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; 187: 112-126.
24. Shin DM, Kim J, Ro JY, Hittelman J, Roth JA, Hong WK et al. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 321-326.
25. Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, van der Waal I. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1998; 184: 360-368.
26. Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, Yamashita Y, Tomoyose T, Zhang M et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without dysplasia. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 513-521.
27. Santos-García A, Abad-Hernández MM, Fonseca-Sánchez E, Cruz-Hernández JJ, Bullón-Sopelana A. Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10: 1-8.

28. Harada K, Ogden GR. An overview of the cell cycle arrest protein, p21^{WAF1}. *Oral Oncol* 2000; 36: 3-7.
29. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366: 701-704.
30. Kuo M, Huang JS, Kok SH, Kuo YS, Chiang CP. Prognostic role of p21^{WAF1} expression in areca quid chewing and smoking-associated oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 16-22.
31. Li R, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. Subcellular distribution of p21 and PCNA in normal and repair-deficient cells following DNA damage. *Cur Biol* 1996; 6: 189-199.
32. Whyte DA, Broton CE, Shillitoe EJ. The unexplained survival of cells in oral cancer: what is the role of p53? *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 125-33.
33. Yook JI, Kim J. Expression of p21^{WAF1/CIP1} is unrelated to p53 tumor suppressor gene status in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1998; 34: 198-203.
34. Agarwal S, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. Expression of cyclin dependent kinase inhibitor p21^{Waf1/Cip1} in premalignant and malignant oral lesions: relationship with p53 status. *Oral Oncol* 1998; 34: 353-360.
35. Warnakulasuriya KAAS, Tavasson M, Johnson NW. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 376-381.
36. Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Ng IOL, McMillan A, Ziober BL et al. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999; 35: 333-342.
37. Weinberg WC, Denning MF. p21^{WAF1} control of epithelial cell cycle and cell fate. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 453-464.
38. Merne M, Heinaro I, Lähteenoja H, Syrjänen S. Proliferation and differentiation markers in snuff-induced oral mucosal lesions. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 259-66.
39. Choi H, 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: 409-414.
40. Adegboyega PA, Boromound N, Freeman DH. Diagnostic utility of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in verrucous squamous carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13: 171-177.

41. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. Tratado de Patologia Bucal. Rio de Janeiro: Interamericana, 1985. 837 p.
42. Barnes L, Eveson JW, Reichart P. Epithelial precursor lesions, In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.), World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press. 2005. p. 177-179.
43. Liu SC, Klein-Szanto AJP. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol* 2000; 36: 145-151.
44. Shin DM, Charuruks N, Lippman SM, Lee JJ, Ro JY, Hong WK et al. p53 protein accumulation and genomic instability in head and neck multistep tumorigenesis. *Cancer Epidemiol Bio & Prev* 2001; 10: 603-609.
45. Gonzalez-Moles MA, Galindo P, Gutierrez J, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Sanchez-Fernandez E. Significance of p53 expression in non-tumoral epithelium adjacent to oral squamous cell carcinomas. *J Laryngol Otol* 2002; 116: 355-358.
46. Pindborg JJ, Reibel J, Holmstrup P. Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. *J Oral Pathol* 1985; 14: 698-708.
47. Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA et al. The effect of clinical information on the histopathologic diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85: 74-77.
48. Hall PA, Lane DP. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry? –Revisited!. *J Pathol* 1994; 172: 1-4.
49. Hall PA, McCluggage WG. Assessing p53 in clinical contexts: unlearned lessons and new perspectives. *J Pathol* 2006; 208: 1-6.
50. Save V, Nylander K, Hall PA. Why is p53 protein stabilized in neoplasia? Some answers but many more questions! *J Pathol* 1998; 184: 348-350.
51. Pillai G, Roberts H, Gatter K, Pezzella F. p53 expression in normal paraffin-embedded tissue using different antibodies and antigen retrieval buffer systems. *Histopathol* 2003, 42: 83–87.
52. Kannan S, Chandran GJ, Pillai KR, Mathew B, Sujathan K, Nalinakumary KR et al. Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa: correlation with expression of Ki67. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1996; 49: M170-M175.
53. Partridge M, Kiguwa S, Emilion G, Pateromichelakis S, A'Hern R, Langdon JDI. New insights into p53 protein stabilisation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999; 35: 45-55.

54. Field JK, Spandidos DA, Stell PM. Overexpression of p53 gene in head-and-neck cancer, linked with heavy smoking and drinking. *Lancet* 1992; 339: 503-503.
55. Lavieille J, Gazzeri S, Riva C, Reyt E, Brambilla C, Brambilla E. P53 mutations and P53, WAF-1, Bax and Bcl-2 expression in field cancerization of the head and neck. *Anticancer Res* 1998;18: 4741-4750.
56. Cox LS. Multiple pathways control cell growth and transformation: overlapping and independent activities of p53 and p21^{Cip1/Waf1/Sdi1}. Review Article. *J Pathol* 1997; 183: 134-140.
57. Cheng M, Olivier P, Diehl JA, Fero M, Roussel MF, Roberts JM et al. The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO* 1999; 18: 1571-1583.
58. Labaer J, Garrett MD, Stevenson LF, Slingerland JM, Sandhu C, Chou HS et al. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev* 1997; 11: 847-862.
59. Ng IOL, Lam KY, Ng M, Regezi JA. Expression of p21/waf1 in oral squamous cell carcinomas-correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. *Oral Oncol* 1999; 35: 63-69.
60. Timofeev OV, Pospelova TV, Pospelov VA. Functions of p21^{WAF1} in norm and in stress. *Mol Biol* 2004; 38: 309-321.
61. Zhang H, Hannon GJ, Beach D. p21-containing cyclin kinases exist in both active and inactive states. *Genes Dev* 1994; 8: 1750-1758.
62. van Oijen MGCT, Tilanus MGJ, Medema RH, Slootweg PJ. Expression of p21(WAF1/CIP1) in head and neck cancer in relation to proliferation, differentiation, p53 status and cyclin D1 expression. *J Oral Pathol Med* 1998; 27: 367-75.
63. Xie X, Clausen OPF, Boysen M. Prognostic significance of p21^{Waf1/Cip1} expression in tongue squamous cell carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 128: 897-902.
64. El-Deiry WS, Tokino T, Waldman T, Oliner JD, Velculescu VE, Burrell M et al. Topological control of p21^{Waf1/Cip1} expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1995; 55: 2910-2919.
65. Tanda N, Mori S, Saito K, Ikawa K, Sakamoto S. Expression of apoptotic signaling proteins in leukoplakia and oral lichen planus: quantitative and topographical studies. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 385-393.

66. Miettinen HE, Paunu M, Rantala I, Kalimo H, Paljärvi L, Helin H et al. Cell cycle regulators (p21, p53, pRb) in oligodendrocytic tumours: a study by novel tumor microarray technique. *J. Neuro-Oncol* 2001; 55: 29-37.
67. Neves AC, Mesquita RA, Novelli MD, Toddai E, Sousa SOM. Comparison between immunohistochemical expression of cyclin D1 and p21 and histological malignancy graduation of oral squamous cell carcinomas. *Braz Dent J* 2004; 15: 93-98.
68. Nadal A, Jares P, Cazorla M, Fernández PL, Sanjuan X, Hernandez L et al. p21^{Waf1/Cip1} expression is associated with cell differentiation but not with p53 mutations in squamous cell carcinomas of the larynx. *J Pathol* 1997; 183: 156-163.
69. Nemes JA, Nemes Z, Márton IJ. p21^{Waf1/Cip1} expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 274-279.
70. Wagner M, Klussmann J, Fangmann R, Linder R, Elewa ME, Eidt S et al. Cyclin-dependent kinase-inhibitor 1 (CDKN1A) in the squamous epithelium of the oropharynx: possible implications of molecular biology and compartmentation. *Anticancer Res* 2001; 21: 333-346.
71. Rosolen MA. Avaliação das alterações microscópicas na leucoplasia bucal por meio de cortes histológicos semi-seriados. 1997. 54f. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
72. Braakhuis BJM, Leemans CR, Brakenho RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 317–22.
73. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol* 2007; 43: 523-534.
74. Horta MCR, Assis LAP, Souza AF, Araújo VC, Gomez RS, Aguiar MCF. p53 ad p21^{WAF1/CIP1} overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 88-92.
75. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Pathologic Basis of Disease. 7th ed. Philadelphia: Saunders, 2004.
76. Holmstrup P, Besserman M. Clinical, therapeutic and pathogenic aspects of chronic, oral multifocal candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 56: 388-396.
77. Pindborg JJ. Clinical relevance of precancerous lesions of oral mucosa. Recent Results. *Cancer Res* 1994; 134: 9-16.

78. Roed-Petersen B, Renstrup G, Pindborg JJ. Candida in oral leukoplakias.
Scand Dent Res 1970; 78: 323-328.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem inúmeros biomarcadores estudados nas diversas pesquisas sobre câncer. Estes marcadores são associados ao diagnóstico, prognóstico e tratamento do câncer. Um dos marcadores mais estudados é a p53. Na literatura há uma vasta relação de trabalhos que utilizam a técnica imunoistoquímica no seu estudo. No entanto, apesar da enorme quantidade de trabalhos publicados a comparação entre estes estudos é difícil. Não existe uma padronização metodológica, nem da quantificação e interpretação dos resultados.

A regulação que envolve p53 é complexa, existe um rígido controle sobre seu nível e suas funções, de forma espacial e temporal, e também em termos de tipo celular. Além disso, existem diversas isoformas de p53 e interações pós-transcricionais com moléculas que podem alterar sua estabilidade, localização e conformação. Todos estes fatores tornam a análise dos resultados complexa. De forma a tornar a interpretação mais precisa, os estudos que avaliam a p53 através da técnica imunoistoquímica deveriam ser acompanhados de análise molecular, para determinar a integridade do gene *TP53*.

A proteína p21^{WAF1} está envolvida em múltiplos processos que envolvem o controle do ciclo celular: proliferação celular, diferenciação e apoptose. Sendo que, em relação a um mesmo processo, pode desempenhar funções opostas, como na proliferação celular e na apoptose. A técnica imunoistoquímica determina apenas se a proteína está presente na população celular estudada, dessa forma, não é possível determinar qual função p21^{WAF1} está desempenhado naquela célula. Todavia, sabe-se que quando não há alterações, p21^{WAF1} se expressa de certa forma e que existe um aumento da sua expressão associado com aumento da severidade da alteração epitelial. Apesar de algumas hipóteses, não existe uma explicação definitiva para esse aumento. Por associação, sugerimos que a acantose representa uma alteração epitelial mais severa em relação à hiperqueratose.

A taxa de transformação maligna de leucoplasias sem displasia epitelial demonstrada em alguns estudos não permite que tais lesões sejam ignoradas e os pacientes tenham seus controles clínicos negligenciados. O período de latência para que ocorra a transformação é variável e dificulta o acompanhamento destes

pacientes. No entanto, não existe ainda uma forma eficaz de identificar os indivíduos que apresentam risco maior de desenvolver uma neoplasia maligna na cavidade bucal. Portanto, todos aqueles que apresentam uma leucoplasia devem ser considerados como de risco. A biópsia e exame histopatológico é indicado sempre. Para determinar de forma concreta se a acantose representa um distúrbio mais severo e com maior risco de transformação maligna seriam necessário estudos longitudinais com acompanhamento prolongado dos indivíduos com tal distúrbio.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

RESOLUÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa e a Comissão de Pesquisas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisaram o Projeto:

Número: 01/07

Título: ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS p53 E p21 NOS DISTÚRBIOS DE MATURAÇÃO EPITELIAL DA MUCOSA BUCAL

Investigador(es) principal(ais): Professor Pantelis V. Rados, Bióloga Isabel da S. Lauxen e C.D. Fernanda Visioli

O Projeto foi aprovado na reunião do dia 20/03/2007, Ata nº 01/07 do Comitê de Ética em Pesquisa e da Comissão de Pesquisas, da UFRGS, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 22 de março de 2007.



Prof^a. Marisa Maltz
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas



Prof^a. Heloisa Emília Dias da Silveira
Coordenadora da Comissão de Pesquisas