

Imunolocalização das proteínas dos genes supressores de tumores TP53 e p16^{CDKN2} no *front* invasivo do carcinoma epidermóide de cavidade bucal

Primeira submissão em 06/06/05
Última submissão em 14/06/06
Aceito para publicação em 22/06/06
Publicado em 20/08/06

Immunolocalization of TP53 and p16^{CDKN2} tumour suppressor genes proteins in invasive front of oral epidermoid carcinoma

Alfredo Maurício Batista De-Paula¹; Sérgio Vitorino Cardoso²; Ricardo Santiago Gomez³

unitermos	resumo
Carcinoma epidermóide	<p>Introdução: A carcinogênese bucal é um processo multipassos no qual eventos genéticos promovem o rompimento de vias regulatórias normais que controlam funções celulares básicas. O carcinoma epidermóide de cavidade bucal (CECB) surge como conseqüência de múltiplos eventos moleculares induzidos pelos efeitos de vários carcinógenos influenciados por fatores ambientais contra um quadro de resistência ou suscetibilidade herdada geneticamente. Objetivo: Avaliar a importância clínica e morfológica da imunoposição das proteínas p53 e p16 na região do <i>front</i> invasivo de uma série de 35 casos rotineiramente processados de CECB. Material e métodos: Amostras de CECB primários tratados exclusivamente por cirurgia foram investigadas. O sistema TNM foi empregado para o estadiamento clínico dos pacientes. Para a gradação morfológica das lesões foi adotado o sistema de gradação do <i>front</i> invasivo. A técnica de imunohistoquímica foi realizada nas lesões fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina para identificação das proteínas p53 e p16. As contagens foram realizadas e submetidas a tratamentos estatísticos específicos. Resultados: As taxas de imunolocalização para as proteínas p53 e p16 foram de 63% e 66%, respectivamente, nas 35 amostras de carcinoma estudadas. Não houve relação entre as expressões das proteínas p53 e p16 com os parâmetros clínico-morfológicos analisados. Não houve correlação entre a expressão imunohistoquímica das proteínas p53/p16. Conclusão: A expressão das proteínas p53 e p16 não influenciou os parâmetros clínico-morfológicos analisados neste estudo e aparentemente não representa base molecular para o significado biológico da região do <i>front</i> invasivo tumoral. A ausência de forte correlação entre as expressões imunohistoquímicas das proteínas p53 e p16 sugere que as mesmas podem participar de atividade biológicas do controle do ciclo celular por vias moleculares independentes.</p>
Cavidade oral	
Genes supressores de tumor	
p53	
p16	
Imuno-histoquímica	
Estadiamento de neoplasias	

abstract key words

Background: Oral carcinogenesis is a multistep process in which genetic events lead to the disruption of the normal regulatory pathways that control basic cellular functions. Epidermoid carcinoma of oral cavity (ECOC) appears as a consequence of multiple molecular events induced by the effects of several carcinogens influenced by environmental factors against a background of genetic resistance or susceptibility. Consequent genetic damage affects many chromosomes and genes, and the accumulation of these changes seems to lead to ECOC. Objectives: The aim of the present study was to assess the clinical and morphological value of p53 and p16 immunolocalization at the invasive tumor front in a representative series of 35 routinely processed ECOC. Material and methods: Samples of ECOC were investigated in this study. TNM system was employed for clinical staging and the invasive front grading system was employed for morphological grading of the lesions. Immunohistochemical technique in paraffin-embedded and formalin-fixed tissues was utilized to immunolocalization of p53 and p16 proteins. Counts were performed and submitted to specific statistical treatments. Results: p53 and p16 immunolocalizations were detected in 63% and 66%, respectively, of 35 carcinomas studied. No correlation was found between p53 and p16 expressions and clinico-morphological parameters statistically analyzed. No correlation was found between the relationship p53/p16 expressions. Conclusion: p53 and p16 immunolocalization did not influence the clinico-morphological parameters analyzed in this study and apparently do not represent a molecular basis for the biologic significance of the invasive tumor front. Lack of a strong correlation between p53 and p16 immunolocalization suggests that both could participate in biological activities in the cell cycle control by independent molecular pathways.

Epidermoid carcinoma
Oral cavity
Tumor suppressor genes
p53
p16
Immunohistochemistry
Neoplasm staging

1. Doutor; professor do Departamento de Diagnóstico Oral da Universidade Estadual de Montes Claros (Unimontes).

2. Doutor; professor do Departamento de Diagnóstico Oral da Unimontes.

3. Doutor; professor do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FOUFMG).

Apoio: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

Resultados parciais de Avaliação de eosinófilos e da imunolocalização dos genes supressores de tumor TP53 e p16^{CDKN2} e interleucinas-4, 6, 8 e 12 na região do *front* invasivo do carcinoma epidermóide de cavidade bucal, tese de doutorado apresentada no Curso de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da UFMG, em 2003.

Introdução

A carcinogênese bucal representa um processo multipassos caracterizado pela ocorrência de vários eventos genéticos promotores de desequilíbrios em vias moleculares regulatórias cruciais. Distúrbios nos mecanismos que controlam os processos de diferenciação, migração e morte celular por apoptose, assim como alterações nas interações epitelio-mesenquimais encontradas na interface entre o tecido normal do hospedeiro e o parênquima neoplásico maligno, contribuem para o estabelecimento e o desenvolvimento do carcinoma epidermóide de cavidade bucal (CECB)⁽³⁷⁾.

O *front* de invasão do CECB, localizado nas regiões mais agressivas da lesão, revela freqüentemente a presença de células com menor grau de diferenciação e maior grau de dissociações celulares, comparado às demais localizações do tumor. Aspectos morfológicos encontrados no *front* de invasão resultam de uma série de anormalidades gênicas responsáveis por alterações moleculares que culminam com a progressão e a disseminação das células neoplásicas malignas. Interações moleculares entre as áreas do *front* CECB e os tecidos normais do hospedeiro são consideradas determinantes para a predição do comportamento biológico da lesão^(3-8, 39). O sistema de gradação morfológico do *front* invasivo representa um conjunto de alterações estruturais e funcionais das regiões mais avançadas do CECB e vários estudos têm utilizado marcadores moleculares para confirmar o real significado biológico dessa região^(22, 26-28).

O sistema tumor, linfonodo, metástase (TNM) de classificação do câncer bucal é o de uso mais difundido entre os clínicos e ainda tem como objetivo prever o prognóstico dos pacientes portadores do CECB. Apesar de grande aceitação clínica, esse sistema de estadiamento apresenta óbvias limitações⁽¹⁵⁾. A implementação de sistemas de gradações morfológicas, associados ao sistema de estadiamento clínico TNM, pode propiciar informações prognósticas mais confiáveis para os pacientes e suas famílias⁽²⁾.

O gene TP53 e seu produto protéico são controladores não-essenciais do crescimento normal e da homeostase de células e tecidos, evitando a proliferação de células que apresentem DNA danificado, agindo, dessa forma, como *guardião do genoma*⁽⁹⁾. O gene TP53 é alvo inicial importante para mutações que podem propiciar os eventos iniciais da carcinogênese bucal, fornecendo vantagem seletiva para a expansão clonal de células neoplásicas⁽⁴⁰⁾. O acúmulo da proteína p53 mutada parece representar a mudança genética mais comumente encontrada nos cânceres huma-

nos^(16, 25) e sua identificação imuno-histoquímica tem sido vastamente relacionada com o comportamento biológico do CECB^(10, 12, 23, 25, 36, 37).

O gene supressor de tumor p16^{CDKN2}, também conhecido como INK4A, CDK4 ou MTS1, codifica uma proteína de mesmo nome que pertence a uma família de inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CDC), ligando-se especificamente às CDC-4/6, com objetivo de evitar a formação de um complexo protéico com as ciclinas D. Como consequência, ocorre um impedimento para a entrada da célula na fase G1 do ciclo celular, pois é o complexo CDC4/6 e ciclina-D1 que fosforila a proteína do retinoblastoma^(14, 18, 21, 24, 31). Uma possível participação da p16 nos mecanismos de senescência celular também tem sido apontada⁽¹³⁾. A inativação do gene p16^{CDKN2} é um evento freqüentemente encontrado em muitos tipos de neoplasias malignas, inclusive o CECB, e sua identificação imuno-histoquímica tem sido utilizada para a avaliação de fatores preditivos e prognósticos do CECB^(17, 21, 24, 30, 35).

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da imunexpressão das proteínas p53 e p16 na região do *front* invasivo do CECB sobre os parâmetros clínico-morfológicos (ocorrência de metástases regionais, tamanho clínico das lesões primárias e severidade da gradação morfológica da região do *front* invasivo). Além disso, também se objetivou verificar se as imunexpressões das proteínas p53 e p16 apresentam algum tipo de correlação.

Material e métodos

Trinta e cinco amostras de CECB confirmado microscopicamente foram avaliadas de forma retrospectiva. Registros médicos dos pacientes e seus espécimes de biópsia foram obtidos em serviços de cirurgia de cabeça e pescoço de hospitais públicos e privados de Belo Horizonte, no período de janeiro de 1999 a janeiro de 2001. As amostras utilizadas foram obtidas exclusivamente de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico, sendo desconsideradas as de pacientes que se submeteram aos procedimentos de rádio e/ou quimioterapia. Somente os pacientes que consentiram com a participação nesse estudo tiveram seus dados analisados.

As amostras foram separadas em grupos, de acordo com: ocorrência ou ausência de metástases cervicais perceptíveis clinicamente, independentemente de número e localização dos nodos metastáticos (grupo 1: N0 e grupo 2: N1, N2 ou N3); tamanho clínico das lesões (grupo 1: T1/T2, para lesões menores que 2cm e grupo 2: T3-T4 para lesões

maiores que 2cm); e agressividade da gradação morfológica do *front* invasivo (grupo 1: F1, grupo 2: F2 e grupo 3: F3). A gradação da severidade morfológica da região do *front* foi realizada de acordo com os critérios de Bryne *et al.*⁽⁵⁾.

Todas as amostras coletadas foram fixadas em formalina 10%, embebidas em parafina, submetidas a cortes microscópicos de 5µm, desparafinizadas e coradas em hematoxilina e eosina (HE). Somente as lesões que apresentaram visível infiltração neoplásica nos tecidos adjacentes foram consideradas. O sistema de gradação de malignidade proposto por Bryne *et al.*⁽⁵⁾ baseia-se em quatro parâmetros morfológicos identificados no parênquima maligno e na sua relação com o estroma normal circunvizinho à lesão. Tais parâmetros são: 1) grau de ceratinização; 2) pleomorfismo nuclear; 3) padrão de invasão; e 4) infiltrado celular inflamatório. Cada parâmetro é graduado num intervalo de 1 a 4 pontos, de acordo com os critérios de agressividade estabelecidos por Anneroth *et al.*⁽¹⁾. O valor total de cada caso é definido como a soma dos pontos atribuídos a cada um dos quatro parâmetros avaliados isoladamente. Dessa forma, a gradação mínima apresenta valor de 4 pontos e a máxima, de 16. Quanto maior a gradação encontrada, maior será considerada a agressividade morfológica da lesão.

A gradação das amostras foi realizada de forma independente por dois patologistas bucais (De-Paula, AMB e Cardoso, SV). Três semanas depois, após nova calibração dos mesmos patologistas, os critérios de gradação foram rediscutidos e os casos de CECB, novamente graduados.

Para a técnica de imuno-histoquímica, as amostras foram submetidas a cortes de 4µm de espessura, desparafinizadas e submetidas a três banhos de solução de ácido cítrico (10mM), pH 6, por cinco minutos, a 700W no microondas, seguindo o protocolo de Shi *et al.*⁽³²⁾. Após bloqueio inespecífico com soro normal de cabra (1:30), as seções foram incubadas com anticorpo monoclonal de rato anti-p53 (clone DO7, Biogenex, Glostrup, Denmark) 1:100 e anti-p16 (clone 16PO4, Newmarkers, Fremont, USA) 1:50, *overnight* a 4°C. Bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado com solução de peróxido de hidrogênio a 1% em metanol, aplicada a temperatura ambiente por 20 minutos. Após incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram vigorosamente enxaguadas com solução-tampão e submetidas à incubação com o complexo estreptoavidina-biotina (Biogenex, Glostrup, Denmark). Diaminobenzidina foi utilizada como cromógeno. As lâminas foram lavadas novamente em solução-tampão e contracoradas com hematoxilina de Mayer.

A imunolocalização das proteínas p53 e p16 foi realizada de forma semiquantitativa. Os casos considerados positivos foram aqueles que apresentaram acima de 5% de células imunomarcadas localizadas na região do *front* de invasão e que demonstraram característica coloração amarronzada nuclear⁽³⁴⁾. Controles positivos para a imunolocalização das proteínas p53 e p16 foram obtidos de uma amostra de carcinoma de mama. Controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários.

Análise estatística entre os resultados da imunolocalização das proteínas p53 e p16 e sua correlação com as variáveis clínico-patológicas (tamanho das lesões/metástases cervicais/gradação morfológica do *front* invasivo) foi obtida com o emprego dos testes de exato de Fisher e de χ^2 , utilizando-se o *software* de estatística SPSS®. Um intervalo de confiança acima de 95% ($p < 0,05$) foi considerado significativo. A análise de reprodutibilidade interexaminador e intra-examinador do sistema de gradação morfológico do *front* de invasão foi realizada pelo emprego do teste estatístico de Kappa.

Resultados

A distribuição das amostras de acordo com as variáveis sexo, idade, localização da lesão, estadiamento clínico e morfológico pode ser observada na **Tabela 1**.

Os valores do teste de Kappa para os exames intra e interexaminador foram, respectivamente, $k_s = 0.816$; $p < 0,05$ e $k_s = 0.712$; $p < 0,05$. Tais valores revelam alto índice de reprodutibilidade do sistema de gradação da agressividade morfológica do *front* de invasão⁽⁵⁾ para ambos os testes.

A imunolocalização das proteínas p53 e p16 apresentou distribuições diferenciadas. Células neoplásicas p53 positivas foram encontradas de forma mais expressiva nas áreas mais invasivas das lesões (*front*), enquanto uma maior imunolocalização para a proteína p16 foi encontrada nas áreas centrais e superficiais (**Figura**). Entretanto, esse achado não foi estatisticamente significativo. Os testes de χ^2 e exato de Fisher não demonstraram a presença de relação estatisticamente significativa para a imunolocalização das proteínas p53 e p16 nas lesões de diferentes tamanhos clínicos, que apresentaram ou não metástases cervicais, e naquelas agrupadas de acordo com a agressividade da gradação morfológica da região do *front* de invasão (**Tabela 2**). Além disso, também não foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre os resultados da imunolocalização das proteínas p53 e p16 nos diferentes grupos estudados (**Tabela 3**).

Distribuição da amostra do estudo segundo idade e sexo dos indivíduos e parâmetros clinicomorfológicos

Tabela 1

Variáveis	n	%
Idade (anos)		
< 61	17	49
≥ 61	18	51
Sexo		
Feminino	9	26
Masculino	26	74
Localização		
Língua	15	43
Assoalho de boca	13	37
Outras regiões	7	20
Tamanho clínico		
T1-T2	15	43
T3-T4	20	57
Metástases cervicais		
Ausente	23	66
Presente	12	34
Gradação morfológica do front*		
F1 (valores entre 4 e 9)	6	17
F2 (valores entre 9 e 12)	20	57
F3 (valores entre 3 e 16)	9	26

*Segundo Bryne et al. (1992).

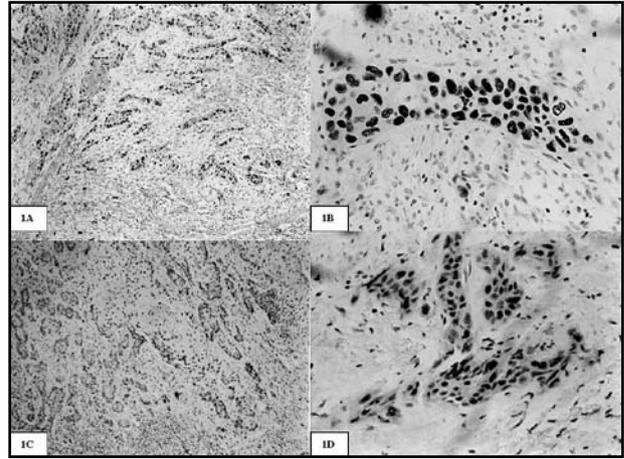


Figura – A: imunolocalização da proteína p53; B: em detalhe, células p53 positivas na região do front de invasão; C: imunolocalização da proteína p16 D-. No detalhe, células p16 positivas na região do front de invasão. Notar maior imunolocalização da p53 nas áreas mais invasivas, ao contrário da encontrada para a proteína p16 (Coloração Diaminobenzidina. Figuras 1A e 1C, aumento de 100x; figuras 1B e 1D, aumento de 400x)

Discussão

Distúrbios nos mecanismos moleculares que controlam os processos de diferenciação, crescimento, migração e morte celular determinam alterações nas interações epiteliomesenquimais encontradas na interface entre o tecido normal do hospedeiro e o parênquima neoplásico maligno, contribuindo, dessa forma, para o estabelecimento e o desenvolvimento do CECB^(3, 5, 8, 39). As regiões mais infiltrativas do CECB, conhecidas como *fronts* de invasão, revelam freqüentemente a presença de células neoplásicas malignas com menor grau de diferenciação e maior grau

Imunolocalização das proteínas p53 e p16 em grupos de lesões de acordo com tamanhos clínicos, ocorrência de metástase e severidade da gradação morfológica

Tabela 2

Imunolocalização	p53				p16			
	+	-	gl	p	+	-	gl	p
Tamanho								
T1/T2 (n = 15)	7	8	1	ns	9	6	1	ns
T3/T4 (n = 20)	15	5			14	6		
Metástases cervicais								
Ausente (n = 23)	14	9	1	ns	15	8	1	ns
Presente (n = 12)	8	4			8	4		
Gradação do front								
F1 (n = 6)	4	2			3	3		
F2 (n = 20)	11	9	2	ns	14	6	2	ns
F3 (n = 9)	7	2			6	3		

*ns: não-significativo; gl: graus de liberdade; + imunolocalização positiva; - imunolocalização negativa.

Relação entre as imunolocalizações das proteínas p53 e p16 em grupos de lesões de acordo com tamanhos clínicos, ocorrência de metástase e gradação morfológica

Tabela 3

	Parâmetros clínicos e morfológicos									
	Metástase cervical			Tamanho			Gradação do <i>front</i>			
	Ausente	Presente	<i>p</i>	T1/T2	T3/T4	<i>p</i>	F1	F2	F3	<i>p</i>
p53+/p16+	10	6		5	11		3	7	5	
p53+/p16-	4	2	ns	2	4	ns	1	3	2	ns
p53-/p16+	5	2		4	3		1	6	1	
p53-/p16-	4	2		4	2		2	3	1	

*ns: não-significativo; + imunolocalização positiva; - imunolocalização negativa.

de dissociação, comparadas com as demais regiões da mesma lesão^(5, 7, 8).

O câncer surge como o resultado de acúmulos de alterações genéticas que promovem situações de desequilíbrio no controle do crescimento celular e dos processos de diferenciação terminal⁽⁹⁾. O gene TP53 é alvo inicial importante para mutações que podem propiciar o desenvolvimento de neoplasias malignas em cavidade bucal^(11, 23, 25, 37). Uma maior imunolocalização da proteína p53 foi encontrada na região do *front* invasivo, comparada com as áreas centrais ou superficiais das mesmas lesões. Esse resultado demonstra que células morfológicamente indiferenciadas, geneticamente mais instáveis e provavelmente com maior potencial de malignidade estão localizadas nas áreas mais invasivas do CECB. Também não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre a imunolocalização da p53 e as variáveis clínico-morfológicas investigadas nesse estudo. Piffkò *et al.*⁽²⁸⁾ demonstraram que, embora uma maior imunolocalização da p53 na região do *front* invasivo seja evento freqüente, esse achado não apresentou relação direta com tamanho clínico das lesões, ocorrência de metástase regional e recidiva local, agressividade morfológica das lesões e prognóstico dos pacientes.

Alterações na proteína p53 conferem vantagem seletiva para a proliferação de células geneticamente instáveis^(26, 36, 38, 40). Entretanto, os resultados do trabalho de Slotweg *et al.*⁽³⁴⁾ mostraram que células neoplásicas malignas poderiam apresentar aumento da taxa proliferativa sem envolver, necessariamente, alterações detectáveis do gene TP53 pela técnica de imuno-histoquímica. Ainda mais, de acordo com Tsai *et al.*⁽³⁵⁾, a imunolocalização da p53 mutada nos tecidos não reflete, necessariamente, aumento inevitável da taxa de proliferação celular. Com relação à influência da proteína p53 sobre o fenômeno de metástase e a severidade morfológica da região do *front* invasivo, parece que

o acúmulo ou estabilização da proteína p53 representa um evento mais decisivo para os estágios iniciais da carcinogênese bucal, em vez de determinar o comportamento clínico da lesão. Assim, uma desregulação do gene TP53 parece ser decisiva para a seleção clonal de células malignas iniciadas, porém não se mostra determinante para a ocorrência dos fenômenos de progressão neoplásica.

O gene p16^{CDKN2} é classificado como um gene supressor de tumor. Ao agir de forma fisiológica, a proteína p16 atua de forma a manter em equilíbrio os eventos relacionados com os fenômenos de proliferação e diferenciação celular. A presença de alterações genéticas no gene p16^{CDKN2} em sua estrutura promoveria, inapropriadamente, a transformação neoplásica maligna do tecido afetado^(18, 21, 24, 31). A técnica de imuno-histoquímica apresenta alto grau de concordância com técnicas moleculares para a detecção de inativação do gene p16^{INK4A}. Dessa forma, a ausência de imunolocalização da proteína p16 revelaria também a ausência da atividade funcional do gene^(21, 30).

Uma maior imunolocalização da proteína p16 foi encontrada nas áreas centrais e superficiais das lesões, com diminuição progressiva da imunolocalização sendo verificada nas regiões dos *fronts* de invasão. Nesse trabalho, semelhante ao resultado encontrado para a imunolocalização da proteína p53, a imunolocalização da p16 ocorreu nas células neoplásicas mais indiferenciadas e geneticamente mais instáveis. Entretanto, a imunolocalização da p16 não apresentou relação estatisticamente significativa entre os parâmetros clínicos e morfológicos avaliados nesse estudo. Pande *et al.*⁽²⁴⁾ demonstraram relação direta entre a ausência de imunolocalização da p16 e a severidade do estadiamento clínico dos pacientes. Slotweg *et al.*⁽³⁴⁾ verificaram maior imunolocalização da p16 em lesões de CECB de pacientes portadores de metástases cervicais e nas lesões com maior grau de indiferenciação celular. Entretanto, os trabalhos

de Matsuda *et al.*⁽¹⁹⁾ e de El-Naggar *et al.*⁽¹¹⁾ demonstraram ausência de relação entre a imunolocalização da p16 e o estadiamento clínico e morfológico de pacientes portadores de CECB. Segundo esses autores, a presença de mutações no gene p16^{CDKN2} parece representar um evento mais decisivo para os estágios iniciais da carcinogênese oral, em vez de determinar o comportamento clínico das lesões e as alterações morfológicas encontradas na região do *front* de invasão.

Uma possível correlação entre as imunolocalizações das proteínas p53 e p16 também não foi identificada nas amostras de CECB, independentemente da classificação das lesões de acordo com tamanho clínico, ocorrência de metástases regionais e agressividade morfológica do *front* de invasão das lesões. Mutações nos genes TP53 e p16^{CDKN2} ocorrem de forma independente, sendo que a inativação de pelo menos um deles se mostra necessária para permitir o crescimento descontrolado das células malignas iniciadas⁽¹⁹⁾. Os genes supressores de tumor TP53 e p16^{CDKN2} participam das atividades biológicas de controle do ciclo celular por vias moleculares independentes⁽³⁶⁾ e a expressão do gene p16^{CDKN2} atua no bloqueio do ciclo celular após dano ao

DNA, mesmo na inativação completa de expressão do gene TP53⁽³²⁾. Entretanto, tem sido levantada a possibilidade de elo de interação entre os genes supressores de tumor TP53 e p16^{CDKN2}, sendo a inibição da enzima cinase dependente de ciclina-2 pela proteína p21 o elemento comum de ambas as vias moleculares⁽²⁰⁾. Estudos futuros que utilizem técnicas de biologia molecular serão determinantes para identificar a possível interação entre os genes TP53 e p16^{CDKN2} e seus componentes moleculares no CECB.

Conclusões

Os resultados de nosso estudo revelaram que o tamanho clínico, a ocorrência de metástases cervicais e a agressividade da gradação morfológica de lesões de CECB não parecem ser diretamente influenciados pela imunolocalização das proteínas p53 e p16. Além disso, a técnica de imuno-histoquímica para identificação de uma possível correlação entre as proteínas p53 e p16 no CECB parece indicar que as atividades biológicas de controle do ciclo celular realizado por essas proteínas ocorrem por vias moleculares independentes.

Referências

1. ANNEROTH, G. *et al.* Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*, v. 95, p. 229-49, 1987.
2. BÄNKFALVI, A.; PIFFKÖ, J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med*, v. 29, p. 291-8, 2000.
3. BRYNE, M. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*, v. 18, p. 432-7, 1989.
4. BRYNE, M. Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. *J Oral Pathol Med*, v. 20, p. 369-72, 1991.
5. BRYNE, M. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*, v. 166, p. 375-81, 1992.
6. BRYNE, M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchow Arch*, v. 427, p. 277-81, 1995.
7. BRYNE, M.; BOYSEN, M.; ALFSEN, C. G. The invasive front of carcinomas. The most important part for tumour prognostication? *Anticancer Res*, v. 18, p. 4757-64, 1998.
8. BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis*, v. 4, p. 70-7, 1998.
9. DARNTON, S. J. p53. *J Clin Pathol Mol Pathol*, v. 51, p. 248-53, 1998.
10. ARAÚJO, V. C. *et al.* p53 biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system. *Oral Oncol*, v. 33, n. 1, p. 5-9, 1997.
11. EL-NAGAR, A. K. *et al.* Expression of p16, Rb, and cyclin D1 gene products in oral and laryngeal squamous carcinoma: biological and clinical implications. *Hum Pathol*, v. 30, n. 9, p. 1013-8, 1999.
12. FAN, G. K.; CHEN, J.; PING, F. *et al.* Immunohistochemical analysis of P57 (kip2), p53 and hsp60 expressions in premalignant and malignant oral tissues. *Oral Oncol*, v. 42, n. 2, p. 147-53, 2006.
13. HARA, E. *et al.* Regulation of p16^{CDKN2} expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*, v. 16, n. 3, p. 859-67, 1996.
14. JIANG, H. *et al.* Requirement of cyclin E-cdk2 inhibition in p16^{INK4A}-mediated growth suppression. *Mol Cell Biol*, v. 18, n. 9, p. 5284-90, 1998.
15. LACY, P. D. *et al.* Development of a new staging system for recurrent oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*, v. 86, n. 15, p. 1387-95, 1999.
16. LEVINE, A. J. *et al.* The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, v. 351, n. 6, p. 453-6, 1991.
17. LIN, S. C. *et al.* Alterations of p16/MTS1 gene in oral squamous cell carcinomas from Taiwanese. *J Oral Pathol Med*, v. 29, p. 159-66, 2000.

18. LUKAS, J. et al. Retinoblastoma protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. *Nature*, v. 75, p. 503-6, 1995.
19. MATSUDA, H. et al. Alterations of p16/CDKN2, p53 and *ras* genes in oral squamous cell carcinomas and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med*, v. 25, p. 232-8, 1996.
20. MITRA, J. et al. Induction of p21^{WAF1/CIP1} and inhibition of cdk2 mediated by the tumor suppressor p16 INK4A. *Mol Cell Biol*, v. 19, n. 5, p. 3916-28, 1999.
21. NAKAHARA, Y. et al. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16INK4A gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett*, v. 163, p. 221-8, 2001.
22. NOGUCHI, M. et al. Invasive front in oral squamous cell carcinoma: image and flow cytometric analysis with clinicopathologic correlation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod*, v. 93, n. 6, p. 682-7, 2002.
23. NYLANDER, K. et al. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med*, v. 29, p. 413-25, 2000.
24. PANDE, P. et al. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol*, v. 34, p. 396-403, 1998.
25. PARTRIDGE, M. et al. New insights into p53 protein stabilisation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, v. 35, p. 45-55, 1999.
26. PIFFKÖ, J. et al. *In situ* assessment of cell proliferation at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Virchows Arch*, v. 429, p. 229-34, 1996.
27. PIFFKÖ, J. et al. Standardized AgNOR analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell carcinomas. *J Pathol*, v. 182, p. 450-6, 1997.
28. PIFFKÖ, J. et al. Molecular assessment of p53 abnormalities at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Head Neck*, v. 20, p. 8-15, 1998.
29. SAKATA, K. Alterations of tumor suppressor genes and the H-ras oncogene in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, v. 25, p. 302-7, 1996.
30. SCHNEIDER, B. G. et al. Loss of p16/CDKN2A tumor suppressor protein in gastric adenocarcinoma is associated with Epstein-Barr virus and anatomic location in the body of the stomach. *Hum Pathol*, v. 31, n. 1, p. 45-50, 2000.
31. SERRANO, M. et al. Role of the INK4a locus in tumour suppression and cell mortality. *Cell*, v. 85, p. 27-37, 1996.
32. SHAPIRO, G. I. et al. p16^{INK4A} participates in a G1 arrest checkpoint in response to DNA damage. *Mol Cell Biol*, v. 18, n. 1, p. 378-87, 1998.
33. SHI, S. R. et al. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method of immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem*, v. 9, p. 1149-63, 1995.
34. SLOOTWEG, P. J. et al. The presence of p53 protein in relation to Ki-67 as cellular proliferation marker in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent dysplastic mucosa. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, v. 30B, p. 138-41, 1994.
35. TSAI, C. H. et al. The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, v. 30, p. 527-31, 2001.
36. WARNAKULASURIYA, K. A.; JOHNSON, N. W. Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med*, v. 21, p. 404-8, 1992.
37. WARNAKULASURIYA, K. A. et al. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, v. 27, p. 376-81, 1998.
38. WILLIAMS, H. K. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma. *J Clin Mol Pathol*, v. 53, p. 165-72, 2000.
39. WOOLGAR, J. A. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, v. 42, n. 3, p. 229-39, 2006.
40. YAN, J. J. et al. Overexpression of p53 protein in squamous cell carcinoma of buccal mucosa and tongue in Taiwan: an immunohistochemical and clinicopathological study. *J Oral Pathol Med*, v. 25, p. 55-9, 1996.

Endereço para correspondência

Alfredo Maurício Batista De-Paula
Departamento de Odontologia, subárea de
Diagnóstico Oral da UNIMONTES
Avenida Dr. Rui Braga, s.n. Campus Darcy Ribeiro
Caixa Postal: 126
CEP 39401-089 – Montes Claros-MG
Tel.: (38) 3229-8000 – Fax: (38) 3224-5396
e-mail: ambpatologi@gmail.com