

Expressão KI-67 e P16^{INK4a} em carcinomas espinocelulares periorais quimicamente induzidos em camundongos.

Expression of Ki-67 and P16^{INK4a} in chemically-induced perioral squamous cell carcinomas in mice.

ÂNGELA VALÉRIA FARIAS ALVES¹; DANIELLE RODRIGUES RIBEIRO¹; SONIA OLIVEIRA LIMA²; FRANCISCO PRADO REIS²; ANDRÉA FERREIRA SOARES³; MARGARETE ZANARDO GOMES⁴; RICARDO LUIZ CAVALCANTI DE ALBUQUERQUE JÚNIOR⁴.

R E S U M O

Objetivo: avaliar a influência da expressão imuno-histoquímica das proteínas Ki-67 e p16^{INK4a} sobre parâmetros clínico-morfológicos em carcinomas espinocelulares periorais quimicamente induzidos com 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA) em modelo murino. **Métodos:** as lesões foram induzidas topicamente na comissura labial de dez camundongos Swiss durante 20 semanas, sendo determinado o momento de surgimento dos tumores e volume tumoral médio até 26 semanas. Na análise histopatológica, as variáveis estudadas foram gradação histológica de malignidade tumoral e expressão imuno-histoquímica das proteínas Ki-67 e p16^{INK4a}. A correlação entre as variáveis estudadas foi determinada pela aplicação do teste de correlação de Spearman. **Resultados:** o tempo médio de surgimento das lesões periorais foi 21,1±2,13 semanas. Volume tumoral médio foi de 555,91±205,52mm³. Dos tumores produzidos, 80% foram classificados como de baixo escore e 20%, alto escore. Evidenciou-se positividade difusa para Ki-67 em 100% das lesões – índice de marcação (PI) de 50,1±18,0. Verificou-se correlação direta forte entre a imunoposição do Ki-67 e o volume tumoral (R=0,702) e fraca correlação com o escore de malignidade (R=0,486). A expressão da proteína p16^{INK4a} foi heterogênea, mostrando fraca correlação com o volume tumoral (R=0,334). Não houve correlação entre a expressão imuno-histoquímica das duas proteínas estudadas. **Conclusão:** Em modelo experimental de carcinogênese perioral DMBA-induzida, a progressão tumoral está associada à fração proliferativa do tumor (células ki-67 positivas) e com a gradação histológica tumoral, porém não com a expressão da p16^{INK4a}.

Descritores: Carcinogênese. 9,10-Dimetil-1,2-benzantraceno. Imuno-Histoquímica. Antígeno Ki-67. Genes p16.

INTRODUÇÃO

Os carcinomas epidermóides ou espinocelulares (CEC) representam as neoplasias orais de maior prevalência, correspondendo a cerca de 90% a 95% dos casos, e são mais incidentes nas regiões de lábio inferior, língua e assoalho bucal¹. Entre os fatores etiológicos destas neoplasias malignas, destaca-se a ação de produtos da combustão do tabaco em indivíduos tabagistas crônicos².

Um dos carcinógenos químicos mais utilizados no estudo de dinâmica neoplásica é o composto 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA), que é um poluente orgânico do tipo hidrocarboneto aromático policíclico, largamente liberado no ambiente, especialmente em função da atividade humana³. O DMBA apresenta propriedades citotóxicas, mutagênicas e imunossupressoras^{4,5}.

A transformação de células normais em malignas é orientada por distúrbios em vários agentes reguladores, positivos e negativos, do ciclo celular. A progressão

do ciclo celular é regulada positivamente por múltiplas ciclinas e cinases dependentes de ciclina, e negativamente por um número de inibidores de cinases dependentes de ciclina⁶.

O Ki-67 é uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M), e que, todavia, está ausente na fase G0 (não ciclantes). A função precisa do antígeno Ki-67 ainda é pouco conhecida, mas tem sido sugerido que esta proteína está possivelmente associada ao nucléolo e aos componentes fibrilares, e ainda parece desempenhar um papel essencial na síntese de ribossomos durante a divisão celular. Estudos têm demonstrado que a expressão imuno-histoquímica da proteína ki-67 apresenta correlação com o potencial proliferativo de tumores malignos orais^{7,8}.

A p16^{INK4a} (p16) é uma proteína oncosupressora codificada pelo gene INK4a (também conhecido como MTS1, CDK4I, ou CDKN2) localizada no cromossomo 9p lócus 21, envolvida no processo de bloqueio da progres-

1. Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Aracaju/SE, Brasil; 2. Curso de Medicina, Universidade Tiradentes, Aracaju/SE, Brasil; 3. Universidade Federal de Sergipe, SE, Brasil; 4. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju/SE, Brasil.

são do ciclo celular, que se apresenta inativa em uma ampla gama de tumores malignos humanos. A perda da expressão imuno-histoquímica da p16^{INK4a} tem sido observada em estágios ainda iniciais da carcinogênese oral e vem sendo considerada um evento molecular de importante valor na análise prognóstica destes tumores^{9,10}.

Este trabalho avaliou a influência da expressão imuno-histoquímica das proteínas Ki-67 e p16 sobre parâmetros morfológicos (volume tumoral médio e gradação histológica de malignidade) em CEC periorais quimicamente induzidos com DMBA em camundongos. Adicionalmente, procurou-se verificar a existência de correlação entre a imunorreatividade das proteínas p16 e Ki-67.

MÉTODOS

O desenvolvimento do estudo contou com a aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Tiradentes – Aracaju/SE, com número do protocolo 191208.

Animais e procedimento de indução de carcinogênese química

Foi utilizado um total de dez camundongos *Swiss*, sem distinção entre sexos, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com massa corporal de aproximadamente 150±30g (Média de idade de 100 dias).

As lesões orais foram induzidas na comissura labial esquerda de camundongos através da aplicação tópica de 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (DMBA), diluído a 0,5% em acetona, em uma frequência semanal de três dias alternados durante 20 semanas¹¹. Após este período, os animais permaneceram sob observação por mais seis semanas, e o momento de surgimento (emergência clínica) dos tumores de cada animal foi devidamente registrado.

Análise macroscópica das lesões DMBA-induzidas

Para determinação do volume tumoral foi utilizado um paquímetro digital a fim de que fossem verificados os diâmetros médios das lesões produzidas, aplicados à seguinte fórmula¹²: $V = 4/3 \cdot \pi \cdot d$, onde: V= volume; $\pi = 3,14$; d = diâmetro médio.

Coleta dos Espécimes e Processamento Histológico

Decorridas 26 semanas, os animais foram sacrificados em câmara de CO² (Insight, Ribeirão Preto, SP

– fluxo contínuo de 100% de CO² por 50 minutos), e posteriormente a área do tumor do camundongo foi submetida à remoção *post-mortem*. Os espécimes teciduais foram fixados em formol tamponado (10%, pH 7,4) por 24 horas, desidratados em soluções crescentes de álcool etílico e diafanizados em xilol, para posterior impregnação e inclusão em parafina.

Para cada tumor foram obtidas 15 secções histológicas de 5µm de espessura, submetidas à coloração de rotina pela Hematoxilina/Eosina. As lesões foram analisadas morfológicamente através da microscopia de luz (Microscópio Óptico Olympus CX31) por dois observadores previamente treinados.

Posteriormente, as amostras foram submetidas a uma análise morfológica pela técnica da hematoxilina e eosina, por meio de microscopia de luz. Foram analisados dez campos histológicos por dois observadores previamente treinados e realizada a classificação tumoral, de acordo com o sistema de gradação histológica de malignidade¹³. Este sistema objetiva tanto a análise da população celular tumoral, como da resposta do hospedeiro, por meio da análise dos parâmetros grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, número de mitoses, padrão de invasão, estágio de invasão e infiltrado linfoplasmocitário, tendo sido estabelecido um escore entre 1 e 4, conforme recomendação dos autores supracitados. O resultado da soma total dos escores estabelecidos foi dividido por seis (número de parâmetros avaliados), a fim de se obter o escore médio final referente a cada caso. Os casos avaliados foram divididos em dois grupos, com base no escore médio final: Grupo I, baixo escore, sendo enquadrados neste grupo os casos cujo valor médio foi menor do que 2,6 e, Grupo II, alto escore, aqueles com valores médios iguais ou maiores do que 2,6.

Análise imuno-histoquímica

Secções histológicas de 3µm de espessura foram montadas em lâminas de vidro previamente silanizadas e submetidas à reação de imuno-histoquímica por meio do método da estreptoavidina-biotina indireta. As secções foram desparafinizadas em xilol e lavadas em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 90%, 80%, e 70%). Para potencializar a reação, foi efetuada a recuperação antigênica por meio da imersão das secções em solução de citrato, aquecido por

20 minutos em micro-ondas. A marcação das proteínas p16^{INK4a} e Ki-67 foi realizada com anticorpos monoclonais de coelho anticamundongo Ab-7 (Neomarkers, Fremont, CA, USA, na diluição 1:100), e MIB-1 (Dako, Glostrup, Denmark, na diluição 1:50), respectivamente, ambos por 30 minutos. A reação foi revelada com o uso da diaminobenzidina (DAB, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) e contracorada com Hematoxilina de Meyer. Ambas as etapas desenvolveram-se em um intervalo de quatro minutos cada. O controle positivo foi realizado com tonsila humana (para o Ki-67) e nevo nevocelular dérmico (para o p16)¹⁴. Para o controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por solução salina tamponada com fosfato na reação.

Interpretação dos resultados da imuno-histoquímica

Células cujos núcleos e/ou citoplasmas foram corados em castanho pelo anticorpo Ab-7 (anti-p16) foram consideradas positivas, independente da intensidade da imunomarcação. A gradação da expressão imuno-histoquímica foi determinada por meio da semi-quantificação da intensidade de marcação (0, negativo; 1, fraca; 2, moderada; 3, forte) e porcentagem de células positivamente marcadas (1, menos que 30%; 2, entre 30 e 60%; 3, mais de 60%). O escore final de cada tumor foi calculado pela soma dos escores de intensidade e porcentagem, conforme previamente descrito por Prowse *et al.*¹⁵. Por sua vez, células cujos núcleos foram corados pelo anticorpo MIB-1 (anti-Ki-67), independente de marcação citoplasmática, foram consideradas positivas. A gradação da imunoexpressão foi determinada pela porcentagem de células positivas em 1000 células contadas.

Análise Estatística

O grau de correlação entre o volume tumoral médio, escore de malignidade, e expressão imuno-histoquímica do antígeno Ki-67 e p16^{INK4a} foi efetuado por meio do teste de correlação linear de Spearman. A correlação foi considerada forte quanto mais próxima de 1 fosse o valor de R.

Para comparar as médias interobservadores, e determinar os valores médios dos escores, foi utilizado o teste t-student com nível de significância estabelecido para um valor $p < 0,05$.

RESULTADOS

Após 26 semanas, todos os animais desenvolveram lesões tumorais periorais, com média e desvio padrão (DP) de surgimento de lesões de $21,1 \pm 2,13$ semanas. O volume tumoral médio \pm DP foi $555,91 \pm 205,52 \text{ mm}^3$.

Com relação à análise histológica dos espécimes, foi observado que todos os tumores visíveis estavam representados por carcinomas epidermóides. Estes se caracterizaram pela proliferação de queratinócitos bem a moderadamente diferenciados, com grau variável de queratinização individual (disqueratose) e em grupo (pérola córnea), infiltrando a mucosa e pele adjacentes. Foi evidenciada ainda reação inflamatória predominantemente linfocítica de intensidade variando entre leve, moderada e intensa. Conforme demonstrado na tabela 1, foi observado que, dos dez casos de carcinoma epidermóide labial, oito (80%) foram classificados como lesões de baixo grau de malignidade, enquanto que apenas dois casos (20%), foram interpretados como de alto grau de malignidade. Foi evidenciada moderada correlação direta entre o volume tumoral médio e o escore de malignidade tumoral ($R=0,659$) (Figura 1).

Conforme demonstrado na tabela 1, todos os tumores analisados mostraram positividade nuclear para o antígeno Ki-67, embora em gradações variadas, com índice proliferativo médio \pm DP (PI) de $50,1 \pm 18,0$. Em tumores com imunomarcação fraca (menos de 30% de células reativas), a positividade imuno-histoquímica foi observada predominantemente nos estratos basal e parabasal dos ninhos e lençóis neoplásicos, enquanto tumores com marcação moderada (entre 30 e 60% de células reativas) e forte (mais de 60% de células reativas), a positividade mostrou-se bastante difusa. Este antígeno também

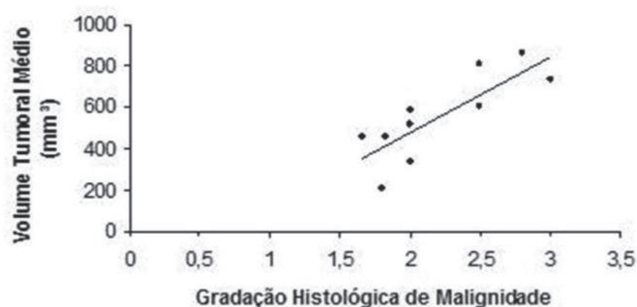


Figura 1 - Grau de correlação entre o volume tumoral médio e a gradação histológica de malignidade tumoral ($R=0,659$).

Tabela 1 - Avaliação histopatológica e imuno-histoquímica dos carcinomas espinocelulares periorais DMBA-induzidos.

Animais	Escore	Volume tumoral médio (mm ³)	Ki-67 (índice PI)	P16INK4a (%)
R1	1,8	207,9585	24	3
R2	2,8	858,965	68	1
R3	2	338,4535	39	3
R4	1,83	455,23	34	2
R5	2	517,0158	40	3
R6	2	583,8648	76	2
R7	3	730,5243	61	1
R8	1,66	455,6454	33	1
R9	2,5	600,6244	59	3
R10	2,5	810,85	67	2
Média	2,209	555,9132	50,1	2,1
DP	0,45797	205,5257	18,05209	0,875595

DP - Desvio Padrão

foi bem expresso em células tumorais ciclantes durante todas as fases da mitose.

Foi observada, ainda, uma forte correlação direta entre o índice PI de células Ki-67 positivas e o volume tumoral médio ($R=0,702$) (Figura 2a), mas fraca entre índice e a gradação histológica de malignidade tumoral ($R=0,486$) (Figura 2b).

No que se refere à expressão imuno-histoquímica do antígeno p16^{INK4a}, observou-se escassa positividade em 30% dos casos, moderada em 30% e intensa em 40% das lesões analisadas. O padrão de imunorreatividade foi bastante heterogêneo, com marcação ora nuclear ora nuclear e citoplasmática. A imunomarcação eminentemente nuclear foi mais comum em células tumorais bem diferenciadas, localizadas na porção superficial do tumor. A positividade nuclear/citoplasmática, por outro lado, foi evidenciada em células tumorais das áreas mais centrais e mais raramente do *front* invasivo tumoral. Áreas queratinizadas (corpos disqueratóticos e pérolas córneas), assim como figuras mitóticas, se mostraram negativas para este antígeno.

A figura 3 mostra imunomarcação para a proteína p16^{INK4a} e positividade imuno-histoquímica para o antígeno Ki-67.

Ao comparar o perfil de expressão da proteína p16^{INK4a} e o volume tumoral médio, foi possível evidenciar apenas uma fraca correlação inversa entre essas duas variáveis ($R=0,334$) (Figura 4a), e ausência de correlação

entre a expressão imuno-histoquímica deste antígeno e a gradação histológica de malignidade tumoral ($R=0,143$) (Figura 4b). Também não foi evidenciada correlação entre a imunomarcação da proteína p16^{INK4a} e do antígeno Ki-67 ($R=0,124$) (Figura 4c).

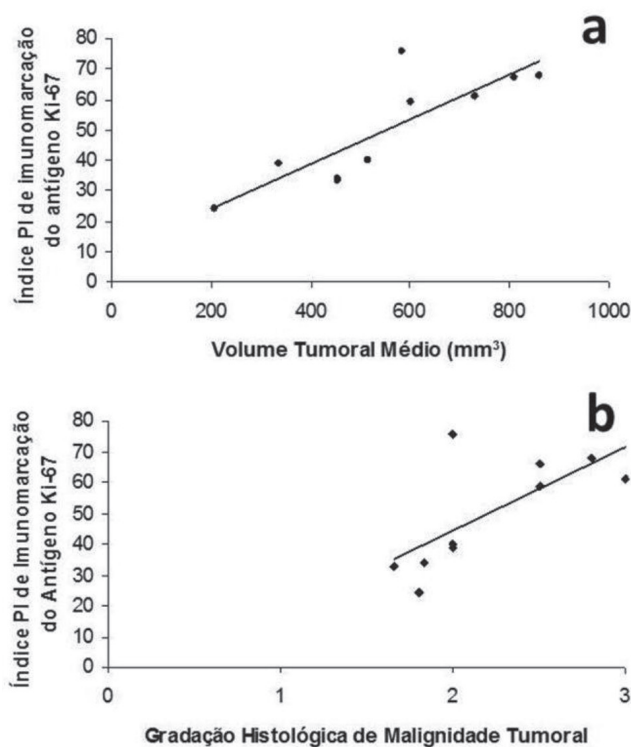


Figura 2 - a) grau de correlação entre o índice PI de imunomarcação para o antígeno Ki-67 e o volume tumoral médio ($R=0,702$); b) grau de correlação entre o índice PI de imunomarcação para o antígeno Ki-67 e a gradação histológica de malignidade tumoral ($R=0,486$).

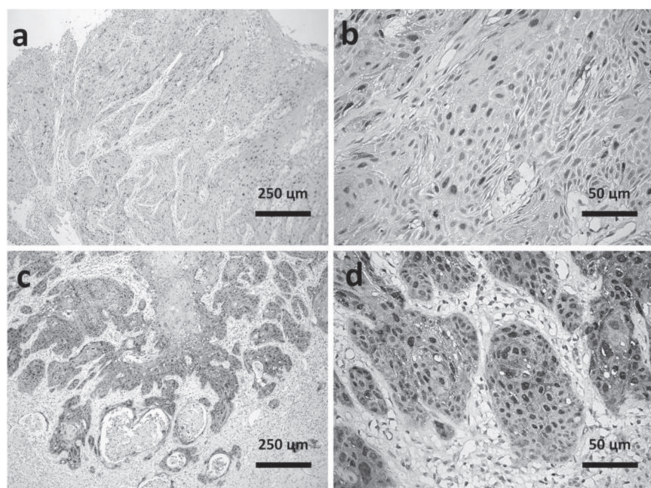


Figura 3 - a) imunomarcção para proteína p16^{INK4a} nas áreas superficiais do tumor; b) detalhe do padrão nuclear e citoplasmático de imunomarcção para p16^{INK4a}; c) positividade imunohistoquímica para o antígeno Ki-67 predominantemente nos estratos basal e parabasal dos ninhos e lençóis neoplásicos; d) detalhe do padrão nuclear do antígeno Ki-67.

DISCUSSÃO

No presente estudo, houve forte correlação direta entre o volume tumoral médio e o escore de malignidade tumoral, ou seja, as lesões classificadas como alto grau apresentaram os maiores índices de crescimento tumoral quando comparadas às de baixo grau, evidenciando que células morfologicamente indiferenciadas são geneticamente instáveis e escapam facilmente dos mecanismos de controle do ciclo celular, com tendência a apresentar elevadas taxas de proliferação celular, em conformidade com outros trabalhos^{16,17}.

A imunorreatividade do Ki-67 relaciona-se à evidência de proliferação celular, de forma que este marcador expressa-se em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G₀, na qual as células estão quiescentes¹⁸. Segundo Sousa *et al.*¹⁹, a análise imunohistoquímica deste marcador constitui em método eficaz para a avaliação da fração de crescimento das neoplasias humanas, fornecendo informação valiosa acerca do prognóstico da doença.

Na amostra analisada, observou-se que a imunomarcção do Ki-67, apresentou-se em gradações variadas, sendo que nas lesões de alto grau houve forte expressão com distribuição difusa. Em algumas lesões de baixo grau, com evidência de elevado

índice de volume tumoral médio, também se constatou forte marcação pelo referido anticorpo, confirmando, portanto, a forte correlação direta encontrada entre o Ki-67 e este parâmetro clínico. Diversos trabalhos relatam a referida correlação, como o de Balassiano²⁰, que analisou a expressão dos marcadores Bcl-2, p53, p53 mutada, caspase-3 e Ki-67 como fatores prognósticos em lesões proliferativas da cavidade oral, tais como hiperplasia fibrosa inflamatória, queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio inferior, e encontrou elevada expressão do Ki-67 em todas as lesões.

A positividade do Ki-67 guardou fraca correlação direta com a gradação histológica de malignidade, isto se deve à instabilidade da imunopressão deste anticorpo, de modo que, segundo trabalho publicado²¹, o Ki-67 permite inferir sobre o momento de vida de uma determinada célula, informando apenas se ela está no ciclo celular²¹. Por isso, é possível que determinada neoplasia tenha alta taxa de proliferação e baixo percentual de células positivas para tal anticorpo.

Alguns autores avaliaram a expressão do PCNA, Ki-67, p53 e bcl-2 em portadores de carcinoma espinocelular de pele (n=10) e ceratose actínica (n=10), e constataram ausência de expressão do Ki-67 em dois casos das referidas lesões, confirmando a existência desta variabilidade na imunorreatividade deste marcador¹⁸. No entanto, é interessante ressaltar que o Ki-67, em diversos trabalhos, apresenta tendência de forte correlação direta com o grau de malignidade da lesão, sendo valorosa a sua contribuição como preditor de prognóstico^{17,18}.

O gene supressor tumoral p16^{INK4a}, que codifica a proteína p16, encontra-se inativado por hipermetilação em diversos tipos de neoplasias malignas, incluindo o carcinoma epidermóide oral (CEO), constituindo evento crucial nos estágios iniciais da transformação maligna do tecido afetado.

Ao utilizar a técnica de imunohistoquímica, é comum evidenciar a ausência de imunorreatividade da proteína p16^{INK4a}, fato que encontra elevada correspondência com os achados providos por técnicas moleculares, as quais evidenciam inativação do gene supracitado^{22,23}.

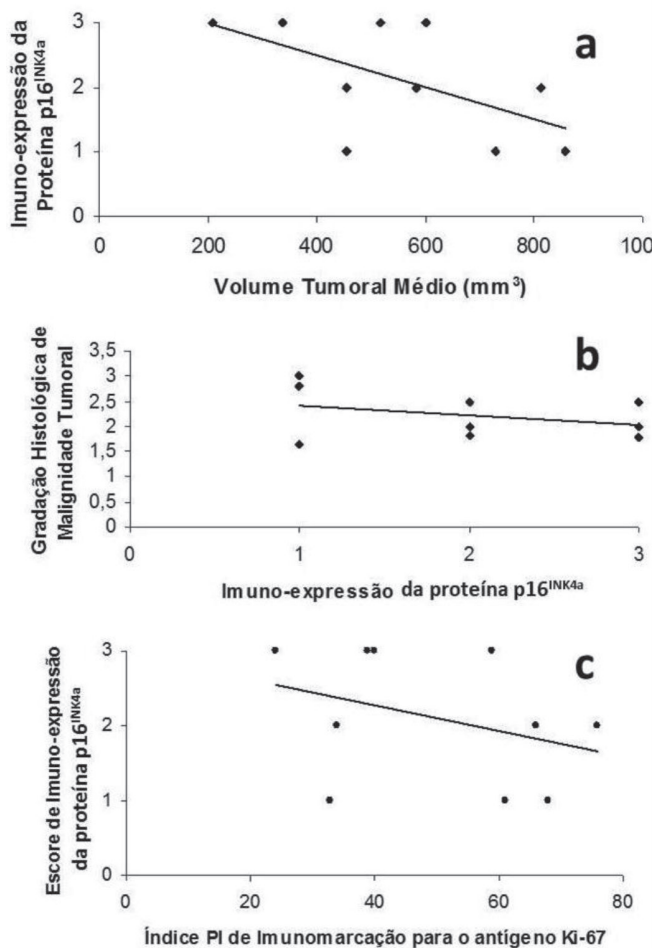


Figura 4 - a) grau de correlação entre a imunoproteína p16^{INK4a} e o volume tumoral médio ($R=0,334$); b) grau de correlação entre a imunoproteína p16^{INK4a} e a gradação histológica de malignidade tumoral ($R=0,143$); c) grau de correlação entre a imunoproteína p16^{INK4a} e a imunomarcção para o antígeno Ki-67 ($R=0,124$).

No grupo experimental, observou-se escassa positividade para a p16^{INK4a} nas lesões de alto grau e nas de baixo grau, de moderada a intensa marcação. A imunoproteína mostrou-se estritamente nuclear em células tumorais bem diferenciadas, especialmente nas áreas superficiais, mas também nas áreas centrais do tumor, corroborando com outro trabalho científico¹⁶ que relatou tendência de imunolocalização da p16 nas áreas centrais e superficiais da massa tumoral, com diminuição progressiva nas regiões do *front* de invasão, onde se concentram as células mais indiferenciadas, com maior grau de perda de adesão celular.

Alguns estudos evidenciam forte relação direta entre a ausência de imunoreatividade da p16 e a severidade da gradação histológica de malignidade e do

estadiamento clínico, no entanto, neste trabalho não foi possível estabelecer a referida correlação, em consonância com outro estudo¹⁶.

Também se constatou fraca correlação inversa entre a expressão da p16^{INK4a} e o volume tumoral, bem como, não houve correlação estatisticamente significativa entre a imunoproteína p16^{INK4a} e do Ki-67.

Segundo os autores supracitados, esta ausência de correlação da p16 com importantes parâmetros prognósticos se deve ao fato de que a inativação do gene p16^{INK4a} e da proteína correlata ocorreria nos estágios iniciais da carcinogênese oral e, por isso, seriam mais eficientes como sinalizadores precoces de transformação maligna do que como marcadores de prognóstico, mostrando-se pouco confiáveis na predição do comportamento biológico de lesões neoplásicas.

Conforme os resultados deste estudo, pode-se verificar que o volume tumoral constitui importante parâmetro clínico na mensuração da agressividade de neoplasias malignas, assim como, a imunoproteína do Ki-67 mostrou-se eficaz como marcador de proliferação celular, no entanto, nem sempre este marcador mostra correlação significativa com o padrão de imunoreatividade de proteínas que regulam o ciclo celular, devido à instabilidade de sua expressão no parênquima tumoral.

Além disso, quando se pretende correlacionar a expressão de proteínas que controlam o ciclo celular com o grau de malignidade do tumor, pode haver contradições, justificadas pelo fato de que estas proteínas ou atuam por vias moleculares independentes, ou em estágios diferentes do ciclo celular e da progressão tumoral, de forma que a sua expressão pode não refletir o potencial proliferativo das lesões malignas.

Concluindo, este trabalho evidenciou que na carcinogênese perioral induzida por DMBA em modelo experimental, a progressão tumoral está associada à fração proliferativa do tumor (células ciclantes Ki-67 positivas) e com a diferenciação tumoral, todavia não apresenta correlação com a expressão da proteína p16^{INK4a}. De modo que, faz-se necessária a elaboração de novos estudos para elucidar os mecanismos de atuação dos genes e proteínas envolvidos no ciclo celular.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the influence of Ki-67 and P16^{INK4a} proteins immunohistochemical expressions on the clinical and morphological parameters of perioral squamous cell carcinoma induced with 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) in mice. **Methods:** we topically induced the lesions in the oral commissure of ten Swiss mice for 20 weeks, determining the time to tumors onset and the average tumor volume up to 26 weeks. In histopathological analysis, the variables studied were histological malignancy grade and the immunohistochemical expression of Ki-67 and P16^{INK4a} proteins. The correlation between variables was determined by application of the Spearman correlation test. **Results:** the mean time to onset of perioral lesions was 21.1 ± 2.13 weeks; mean tumor volume was 555.91 ± 205.52 mm³. Of the induced tumors, 80% were classified as low score and 20% high score. There was diffuse positivity for Ki-67 in 100% of lesions – Proliferation Index (PI) of 50.1 ± 18.0 . There was a strong direct correlation between Ki-67 immunoreactivity and tumor volume ($R = 0.702$) and a low correlation with the malignancy score ($R = 0.486$). The P16^{INK4a} protein expression was heterogeneous, showing a weak correlation with tumor volume ($R = 0.334$). There was no correlation between the immunohistochemical expression of the two proteins studied. **Conclusion:** in an experimental model of DMBA-induced perioral carcinogenesis, tumor progression was associated with the tumor proliferative fraction (Ki-67 positive cells) and with tumor histological grading, but not with P16^{INK4a} expression.

Keywords: Carcinogenesis. 9,10-Dimetil-1,2-benzanthracene. Immunohistochemistry. Ki-67 Antigen. Genes, p16.

REFERÊNCIAS

- Melo AUC, Albuquerque Júnior RLC, Melo MFB, Ribeiro CF, Santos TS, Gomes ACA. Análise das estimativas de incidência de câncer de boca no Brasil e em Sergipe (2000 - 2010). *Odontol Clín-Cient.* 2012; 11(1):65-70.
- Turati F, Garavello W, Tramacere I, Pelucchi C, Galeone C, Bagnardi V, et al. A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers: results from subgroup analyses. *Alcohol Alcohol.* 2013;48(1):107-18.
- Saha D, Hait M. An ontological design: two stage mouse skin carcinogenesis induced by DMBA and promoted by croton oil. *Asian J Res Pharm Sci.* 2012;2(1):1-3
- Lindhe O, Granberg L, Brandt I. Target cells for cytochrome p450-catalysed irreversible binding of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in rodent adrenal glands. *Arch Toxicol.* 2002;76(8):460-6.
- Buters J, Quintanilla-Martinez L, Schober W, Soballa VJ, Hintermair J, Wolff T, et al. CYP1B1 determines susceptibility to low doses of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced ovarian cancers in mice: correlation of CYP1B1-mediated DNA adducts with carcinogenicity. *Carcinogenesis.* 2003;24(2):327-34.
- Zheng J, Xie L, Teng H, Liu S, Yoshimura K, Kageyama I, Kobayashi K. Morphological changes in the lingual papillae and their connective tissue cores on the 7,12-dimethylbenz[alpha]anthracene (DMBA) stimulated rat experimental model. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2009;85(4):129-37.
- Rapids AD, Gullane P, Langdon JD, Lefebvre JL, Scully C, Shah JP. Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):299-300.
- Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol.* 2010;46(6):407-10.
- Hong Y, Li C, Xia J, Rhodus NL, Cheng B. p16(CDKN2A) expression during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline-1-oxide. *Oral Oncol.* 2009;45(7):640-4.
- Ohta S, Uemura H, Matsui Y, Ishiguro H, Fujinami K, Kondo K, et al. Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(1):81-91.
- Kavitha K, Manoharan S. Anticarcinogenic and antilipidperoxidative effects of Tephrosia purpurea (Linn.) Pers. in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) induced hamsters buccal pouch carcinoma. *Indian J Pharmacol.* 2006;38(3):185-9.
- Mizuno M, Minato K, Ito H, Kawade M, Terai H, Tsuchida H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* mill. *Biochem Mol Biol Int.* 1999;47(4):707-14.

13. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987;95(3):229-47.
14. Hsieh R, Sousa FB, Firmiano A, Nunes FD, Magalhães MHCG, Sotto MN. Estudo genético do gene p16 pela técnica de PCR-SSCP e expressão de proteína p16 em melanomas de mucosa oral e melanomas cutâneos. *An Bras Dermatol*. 2006;81(5):433-41.
15. Prowse DM, Ktori EN, Chandrasekaran D, Prapa A, Baithun S. Human papillomavirus-associated increase in p16INK4A expression in penile lichen sclerosus and squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2008;158(2):261-5.
16. De-Paula AMB, Cardoso SV, Gomez RS. Imunolocalização das proteínas dos genes supressores de tumores TP53 e p16CDKN2 no front invasivo do carcinoma epidermóide de cavidade bucal. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(4):285-91.
17. Rodrigues RB, Motta RR, Machado SMS, Cambruzzi E, Zettler EW, Zettler CG, et al. Valor prognóstico da correlação imuno-histoquímica do Ki-67 e p53 em carcinomas epidermóides da laringe. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2008;74(6):855-9.
18. Dornelas MT, Rodrigues MF, Machado DC, Gollner AM, Ferreira AP. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose no carcinoma espinocelular de pele e ceratose actínica. *An Bras Dermatol*. 2009;84(5):469-75.
19. Sousa FACG, Brandão AAH, Almeida JD, Rosa LEB. Alterações gênicas e câncer bucal: uma breve revisão. *Rev bras patol oral*. 2004;3(1):20-5.
20. Balassiano KZ. Estudo comparativo expressão imuno-histoquímica das proteínas p53, caspase-3 e Ki-67 em hiperplasias fibrosas inflamatórias, queilites actínicas e carcinomas de células escamosas no lábio inferior [dissertação]. Niterói/RJ: Universidade Federal Fluminense; 2004.
21. Correa MPD, Ferreira AP, Gollner AM, Rodrigues MF, Guerra MCS. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose em carcinoma basocelular. *An Bras Dermatol*. 2009;84(6):606-14.
22. von Zeidler SV, Miracca EC, Nagai MA, Birman EG. Hypermethylation of the p16 gene in normal oral mucosa of smokers. *Int J Mol Med*. 2004;14(5):807-11.
23. Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, et al. Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology*. 2005;68(4-6):314-25.

Recebido em: 13/10/2015

Aceito para publicação em: 02/03/2016

Conflito de interesse: nenhum.

Fonte de financiamento: nenhuma.

Endereço para correspondência:

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

E-mail: ricardo_luiz@unit.br