

RENATA CASELLATO MAZON

**“Papilomavírus Humano (HPV) e a carcinogênese de
mucosa oral: avaliação imunohistoquímica das
proteínas p27, mdm2 e catepsina B”**

ARARAQUARA

2007

RENATA CASELLATO MAZON

**“PAPILOMAVÍRUS HUMANO E A CARCINOGENESE DE
MUCOSA ORAL: AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS p27, mdm2 E catepsina B”**

**Dissertação apresentada ao curso de
Pós - graduação em Análises Clínicas
da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas – UNESP –
Araraquara como pré-requisito para
obtenção do título de mestre.**

Orientadora: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

Araraquara

2007

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Christiane Pienna Soares (orientadora e presidente)

Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain (membro titular)

Profa. Dra. Maria Regina Sposto (membro titular)

Prof. Dr. Rui Celso Martins Mamede (membro suplente)

Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini (membro suplente)

Araraquara, 01 de Junho de 2007

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Christiane Pienna Soares, pela confiança, apoio, incentivo e por contribuir em minha formação científica e pessoal.

Aos meus colegas de laboratório, pelo apoio e auxílio na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Dulce e Antônio, que com muito amor, não mediram esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos e que estão sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu noivo Fábio, pelo seu carinho e incentivo que me foram dados para seguir em frente e por completar a minha vida, me fazendo muito feliz.

SUMÁRIO

Abreviaturas.....	05
Lista de figuras.....	06
Lista de tabelas.....	07
Resumo.....	08
Abstract.....	09
1. Introdução.....	10
1.1. Câncer Oral.....	11
1.2. Fatores de Risco.....	12
1.3. Papilomavírus Humano (HPV).....	13
1.4. HPV e Câncer oral.....	15
2. Objetivos.....	25
2.1. Objetivo Geral.....	26
2.2. Objetivos Específicos.....	26
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1. Casuística.....	28
3.2. Metodologias.....	28
3.2.1. Reação de Imunohistoquímica (p27, mdm2 e catepsina B).....	28
3.2.1.1. Controles.....	29
3.2.2. Captura e Análise de Imagem.....	29
3.2.3. Quantificação Interobservador.....	30
3.2.4. Interpretação.....	30
3.3. Detecção e Tipagem do HPV.....	30
3.3.1. Extração de DNA genômico de tecido parafinado.....	30
3.3.1.1. Amplificação do HPV e de beta-globina.....	31
4. Análise Estatística.....	33
5. Resultados.....	35
6. Discussão.....	44
7. Conclusões.....	50
8. Referências Bibliográficas.....	52

ABREVIATURAS

HPV – Papiloma vírus humano

RB - Retinoblastoma

OFR – Open reading frames

LCR – Long control region

MAPK – Mitogen activated protein kinase

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

CDK – Kinase dependente de ciclina

PCNA – Antígeno de proliferação celular

MDM2 – Murino duplo minuto

MMP – Metaloproteinase

HCl – Ácido clorídrico

PBS – Solução salina tamponada

PBS/BSA - Solução salina tamponada com solução de albumina bovina

PCR – Reação de polimerase em cadeia

IP – Índice de positividade

IM - Imagem

IO – Interobservador

RPA – Replication protein A

CBP – CREB binding protein

TAF – TBP, associated factors

TBP – TATA – box binding protein

XRCC1 – NER, nucleotide excision repair

KU70/80 – NHEJ, nonhomologous end-joining

hMSH2 e hMSH1 - MMR mismatch repair

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Representação esquemática do genoma circular do HPV 16. Os genes precoces (E), tardios (L) e a região regulatória (LCR) estão indicados.....14
- FIGURA 2.** Representação esquemática do complexo ciclina/CDK nas diferentes fases do ciclo celular e *checkpoints* nas fases G1, G2 e M.....20
- FIGURA 3.** Representação esquemática da inativação do complexo ciclina/CDK pela p27..20
- FIGURA 4.** Representação esquemática da função da proteína mdm2 de ubiquitina ligase encaminhando p53 para a degradação proteossômica no citoplasma.....22
- FIGURA 5.** Representação esquemática da função da catepsina B.....23
- FIGURA 6.** Reação de polimerização em cadeia (PCR) em gel de poliacrilamida 10%.....37
- FIGURA 7.** Imunoperoxidase para p27 em lesões orais.....41
- FIGURA 8.** Imunoperoxidase para mdm2 em lesões orais.....42
- FIGURA 9.** Imunoperoxidase para catepsina B em lesões orais.....43

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Tipificação do Papilomavírus humano (HPV) em 55 lesões de cavidade oral, estratificadas de acordo com o diagnóstico histológico.....36
- TABELA 2.** Expressão quantitativa de p27, mdm2 e catepsina B lesões orais infectadas por HPV.....38
- TABELA 3.** Média e Erro Padrão ($M \pm EP$) da a expressão imunohistoquímica quantitativa de p27, mdm2 e catepsina B por análise de imagem (IM) e análise interobservador (IO).....39
- TABELA 4.** Índice de positividade (IP) de p27, mdm2 e catepsina B: imunopositividade quantitativa em lesões orais, de acordo com o diagnóstico histológico.....40

RESUMO

O mdm2 parece controlar o tráfego da proteína p53 do núcleo-citoplasma enquanto a proteína p27 é um inibidor de CDK que controla a fase G1 para S do ciclo celular. Em contraste, a catepsina B parece induzir um sinal de apoptose independente de caspase na presença do HPV. Entretanto, a influência da infecção pelo HPV na carcinogênese oral e o envolvimento na desregulação das proteínas do ciclo celular não são claras. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a associação entre a expressão de proteínas do ciclo celular, p27, mdm2 e catepsina B e câncer oral na presença do HPV. Cinquenta e cinco biópsias orais representando lesões benignas (LB), lesões potencialmente malignas (LPM) e lesões malignas (LM). A detecção e tipagem do HPV (6/11,16,18, 31 e 33) foi realizada pela reação da polimerase em cadeia (PCR). A expressão quantitativa de p27, mdm2 e catepsina B foi analisada pela reação imunohistoquímica. Vinte e uma (38%) de 55 lesões orais foram positivas para HPV. O DNA do HPV 6/11 foi encontrado em 6 (33%), HPV 16 em 1(5%) e o HPV 18 em 14 (72%). Não foi encontrado HPV 31 e 33. De 55 biópsias, foi encontrada alta expressão de todas as proteínas: o p27 foi encontrado em 37 (67,2%) lesões, mdm2 em 17 (30,9%) e a catepsina B em 37 (67,2%). Entre lesões orais de HPV positivo, uma superexpressão de p27, mdm2 e catepsina B foi encontrada, respectivamente, em 6 (33%) de 18 lesões benignas, 4 (22%) de 18 lesões potencialmente malignas e 11 (57,9%) de 19 lesões malignas. Adicionalmente, o HPV16/18 (11/58%) foi detectado em lesões malignas com alta expressão de todas as proteínas. Nós concluímos que os tipos de HPVs de alto risco devem estar associados com carcinoma oral, bem como, com a superexpressão de p27, mdm2 e catepsina B. Estes resultados sugerem que os tipos de HPVs de alto risco podem desregular o controle do ciclo celular, contribuindo para a carcinogênese oral.

ABSTRACT

Mdm2 seems to control p53 nucleus-cytoplasm traffic while p27 is a CDK inhibitor which control G1 to S phase of the cell-cycle. In contrast, cathepsin B is reported in HPV-induced apoptotic signalling caspase-independent. However, the influence of HPV infection in oral carcinogenesis and its involvement to this cell-cycle proteins dysfunction remain still unclear. The purpose of this study was to clarify the association between the expression of cell-cycle proteins, p27, mdm2 and cathepsin B and oral cancer HPV-related. Fifty-five oral biopsies presenting benign oral lesions (BL), potentially malignant lesions (PML) and malignant oral lesions (ML). HPV detection and typing (6/11, 16, 18, 31 and 33) was performed using polymerase chain reaction. p27, mdm2 and cathepsin B quantitative expression were performed by immunohistochemistry. Twenty one (38%) of the 55 oral lesions were positive for HPV, of which HPV6/11 DNA was found in 6 (33%), HPV 16 in 1(5%) e o HPV 18 in 14 (72%). No HPV positivity was found to HPV31 and 33. Of the 55 biopsies, a high expression of all proteins was found: to p27 in 37 (67,2%), mdm2 was observed in 17 (30,9%) slides, and cathepsin B in 37 (67,2%). Among HPV-positive oral lesions, an overexpression for mdm2, p27 and cathepsin B was found, respectively, in 6 (33%) out of 18 BL, 4 (22%) out of 18 PML and 11 (57,9%) out of 19 ML. In addition, HPV16/18 (11/58%) was detected in OSSC with high expression of all proteins. We conclude that high-risk HPV types might be associated with oral carcinoma, as well as, with the overexpression of mdm2, p27 and cathepsin B. These results suggest that high-risk HPV types might deregulate cell-cycle control, contributing to oral carcinogenesis.

1. INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER ORAL

Anualmente, aproximadamente 620.000 pacientes são diagnosticados com câncer da cavidade oral, naso-faringe, oro-faringe e laringe (SYRJÄNEN, 2005). O câncer oral é o sexto tipo de câncer mais prevalente do mundo (ST JOHN et al., 2006), o terceiro em países em desenvolvimento e o oitavo em países desenvolvidos. Mais de 80% dessas lesões são carcinomas de células escamosas. De acordo com a estatística mundial, aproximadamente 267.000 novos casos foram diagnosticados e cerca de 128.000 pacientes morreram desse tipo de câncer no ano de 2000 (FERLAY et al., 2001). As áreas de alto risco incluem França, Hungria, Índia, Brasil, China e Filipinas (SYRJÄNEN, 2005); nos Estados Unidos, os cânceres da cavidade oral e de orofaringe são o nono mais comum (JEMAL et al., 2005) e cerca de 29.000 casos por ano são diagnosticados (WALKER et al., 2003).

O carcinoma oral é a neoplasia mais comum na mucosa oral, representando 90% dos tumores malignos dessa região (SCULLY et al., 2000; BIRNER et al., 2001; KUFFER e LOMBARDI, 2002; WALKER et al., 2003; GONÇALVES et al., 2007). Esses tumores contribuíram com em média 2,7% e 0,7% do total de mortes causadas por câncer entres homens e mulheres, respectivamente, no período compreendido entre 1980-1995 (WÜNSCH-FILHO, 2002). Recentes dados epidemiológicos do Ministério da Saúde do Brasil demonstram que as taxas anuais de incidência do câncer de boca, ajustadas por idade, são maiores entre a população masculina do estado de São Paulo (7,6/100.000 habitantes) e, na população feminina (3,3/100.000 habitantes) em Natal. (GUERRA et al, 2005). Em contrapartida, a mortalidade populacional associada ao câncer de boca no estado de São Paulo permaneceu estacionada em níveis elevados entre os anos de 1980 a 1998.

Como o câncer oral é mais freqüente em pessoas idosas, essas taxas aumentam dramaticamente quando ajustadas de acordo com a faixa etária. Para indivíduos entre 35-64 anos, a taxa de incidência aumenta de 3,0 para 7,0 em mulheres e de 9,5 para 34,0 nos homens, por 100 mil habitantes. Na faixa etária igual ou superior a 65 anos essa incidência aumenta ainda mais, atingindo 36,8 para as mulheres e 97,3 nos homens, por 100 mil habitantes (ANTUNES et al., 2001). O diagnóstico do câncer oral é simples e deve ser precoce, pois sua evolução natural é rápida e num estágio avançado não é possível o tratamento, culminando com a morte do indivíduo (KOWALSKI e CARVALHO, 2001). Adicionalmente, a média de vida de um paciente com câncer oral é de aproximadamente 5 anos em 40 a 50% dos casos e algumas vezes essa mortalidade tem sido atribuída ao acesso de determinados pacientes a serviços especializados (BROUHA H., 2005).

Dentre os tumores de cabeça e pescoço, o carcinoma oral é o tumor maligno mais freqüentemente encontrado na mucosa oral (KUFFER; LOMBARDI, 2002), podendo ou não ser precedido por lesões potencialmente malignas, que podem apresentar-se clinicamente como leucoplasias, eritroplasias, leucoeritroplasia (NEVILLE; DAY, 2002). O câncer oral pode ser encontrado na língua, lábio e assoalho bucal, entre outros, correspondendo cerca de 95% dos tumores malignos da cavidade oral (GERVÁSIO et al., 2001; COLETTA et al., 2002; SYRJÄNEN, 2005). Durante a última década, um maior interesse tem ocorrido em relação às alterações celulares que precedem o carcinoma oral. Essas alterações podem se desenvolver a partir de vários tipos de lesões, como por exemplo as leucoplasias (KUFFER; LOMBARDI, 2002). A leucoplasia oral é conceituada como uma lesão predominantemente branca que clinicamente não pode ser caracterizada como qualquer outro tipo de lesão (AXÉLL et al., 1996; SYRJÄNEN, 2005), sendo considerada uma lesão potencialmente maligna (VAN DER WAAL et al., 1997; ONOFRE et al., 2001; VAN DER WAAL; AXÉLL, 2002; GONÇALVES et al., 2007). As leucoplasias apresentam padrões e aspectos semelhantes, porém, microscopicamente, são muito heterogêneas, variando da hiperqueratose benigna ao carcinoma invasor de células escamosas. As características histológicas das leucoplasias podem eventualmente estar associadas a um maior risco de transformação maligna, podendo ser classificadas segundo o grau de displasia (REGEZI et al., 2000; VAN DER WALL, 2000). Assim, o entendimento dos eventos molecular que modulam o ciclo celular, tem trazido importantes informações para a compreensão da carcinogênese oral.

1.2. FATORES DE RISCO

Nas regiões geográficas de maior prevalência de câncer oral, o hábito de fumar e a ingestão regular de álcool parecem estar diretamente relacionados ao desenvolvimento desse tipo de carcinoma, totalizando 90% dos cânceres orais; o risco de câncer aumenta com o consumo de álcool (IBRAHIM et al., 1999; REIBEL, 2003; COGLIANO, 2004). Assim, o hábito de fumar e a ingestão regular de álcool são os principais fatores de risco para o câncer oral e de orofaringe (WEINBERG e ESTEFAN, 2002).

Em relação ao fumo, um estudo no Rio de Janeiro revelou que 76,5% dos pacientes com câncer oral eram fumantes, enquanto outro estudo realizado nas cidades de São Paulo, Curitiba e Goiânia também apontaram uma forte associação entre o fumo e o aumento da incidência de câncer oral. Esse e outros estudos também indicam o consumo de álcool,

especialmente destilados, como contundente fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias orais (FRANCO et al., 1989; LEITE; KOIFMAN, 1998; WUNSCH FILHO, 2002). Existe uma clara evidência de que pacientes com câncer oral apresentam maior dano no DNA do que pessoas com hábitos similares de consumo de álcool e fumo, mas sem neoplasia (ARTRUP, 2000; SCULLY; PORTER, 2000).

O desenvolvimento do carcinoma oral em diferentes sítios anatômicos está associado à cofatores distintos. No carcinoma de lábio inferior, a participação da radiação solar como fator de risco está bem estabelecida. Em contrapartida, a etiologia dos carcinomas intra-buciais, principalmente de língua, é atribuída ao fumo e ao álcool (BUNDGAARD et al., 1994; COLETTA et al., 2002), e além desses, vários estudos apontam a infecção do vírus HPV no desenvolvimento desse tipo de câncer (NAGPAL; DAS, 2003; XAVIER et al., 2005; TRAN, 2007; RAGIN et al., 2007)).

1.3. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

O HPV é um vírus de DNA, da família *Papovaviridae*, identificado primeiramente por STRAUSS, em 1949, e, desde então, vem sendo isolado em inúmeras espécies animais. As partículas virais completas não são envelopadas e o capsídeo protéico tem padrão icosaédrico, possuindo 55 nm de diâmetro. No interior do capsídeo, o DNA é circular e dupla fita, medindo de 7500 a 8000 pares de bases (pb) (HOWLEY, 1994; MAJEWSKI, 1997; ZUR HAUSEN, 2002).

O ciclo de vida dos papilomavírus humanos está ligado ao processo de diferenciação celular do epitélio (STUBENRAUCH; LAIMINS, 1999; ZUR HAUSEN, 2000; HEBNER; LAIMINS, 2006). Os genomas virais contêm duas regiões principais compostas por ORFs (*open reading frames*) que codificam as proteínas virais (Figura 1). A região E (*early*) é constituída por 8 genes (E1-E8, sendo que E3 e E8 não têm função conhecida) e codifica para proteínas envolvidas na replicação viral, e, para os HPVs de alto risco, no processo de imortalização. A região L (*late*) codifica para as proteínas estruturais necessárias para a produção do capsídeo, onde L1 é altamente conservado entre os diferentes tipos de papilomavírus, enquanto o gene L2 é menos conservado, apresentando mais seqüências variáveis (MOTOYAMA, 2004; DOORBAR, 2005). Além dessas, ainda existe uma região regulatória que contém a origem para a replicação viral e controla a transcrição de alguns genes da região E (HEISE, 2003). Algumas das proteínas codificadas pela região *early* são

capazes de interagir com várias proteínas da célula hospedeira, interferindo com processos como controle do ciclo celular, resposta apoptótica, sinalização celular e expressão gênica (ZUR HAUSEN, 2000).

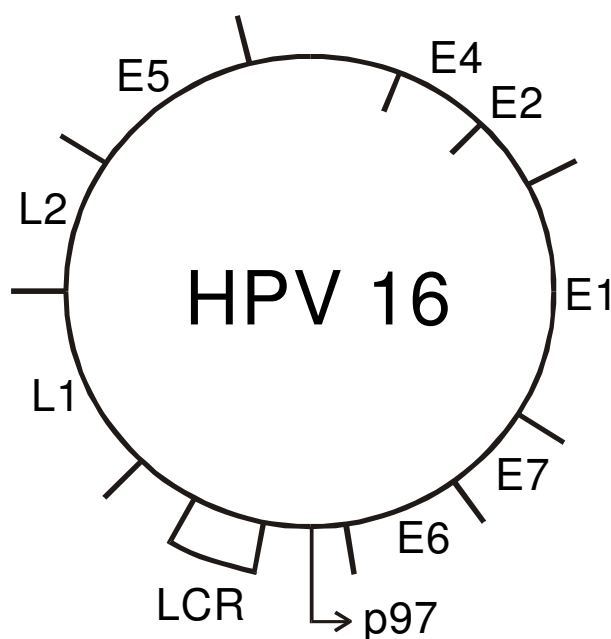


Figura 1 - Representação esquemática do genoma circular do HPV 16. Os genes precoces (E), tardios (L) e a região regulatória (LCR) estão indicados. Fonte: Extraída de Villa, 1997.

Por exemplo, E1 possui atividade helicase e ATPase e interage com várias proteínas da maquinaria de replicação, como DNA pol α e RPA (*replication protein A*), chaperonas (HSP40 e 70), as quais devem auxiliar a união de E1 ao DNA, e histona H1, o que implica E1 em processos de remodelamento da cromatina (WILSON et al., 2002). O produto do transcrito viral mais abundante, E1-E4, é capaz de unir-se a rede de citoqueratina, desestabilizando-a, de impedir a progressão das células para a mitose, causando parada na fase G2, e de se unir à mitocôndria e reduzir seu potencial de membrana induzindo apoptose (DAVY et al., 2002; HEISE, 2003). A proteína E5 interfere com a regulação de receptores de fatores de crescimento celular, atuando de modo importante sobre EGFR (McMURRAY et al., 2001; TSAI e CHEN, 2003), influenciando a ativação da via de sinalização das MAP quinases (MAPK, *mitogen activated protein kinases*), como ERK1/2 e p38MAPK, ativando

oncogenes como c-jun, junB e c-fos (CRUSIUS et al., 2000; TSAI; CHEN, 2003), e inibindo a apoptose mediada por TRAIL e FasL, além de reprimir a expressão de CDKN1/p21, interferindo com o controle negativo do ciclo celular (TSAO et al., 1996; KABSCH; ALONSO, 2002; KABSCH et al., 2004).

O HPV tem tropismo por células epiteliais de pele e mucosa, causando proliferação benigna ou maligna, na dependência do tipo viral, decorrente do modo de interação, epissomal ou integrada, entre o vírus e a célula. Portanto, esta interação determina o potencial oncogênico de determinados tipos virais em sítios anatômicos prevalentes. Alguns tipos são encontrados com maior frequência em lesões malignas de pele (HPV 5 e 8) e os tipos 16, 18, 31, 33 e 45 nas mucosas. Outros tipos são encontrados mais comumente em lesões benignas, como o HPV1 e 2 (pele) e 6, 11 e 42 (mucosas). A infecção de pele e mucosas pelo HPV ocorre através de microlesões existentes na camada basal do tecido (ZUR HAUSEN, 1996; 2002).

Os HPVs podem ser classificados de baixo risco ou alto risco baseado no potencial para indução de transformação maligna. Os vírus de baixo risco (6 e 11), tipicamente causam lesões benignas e são raramente associados com malignidade (ZUR HAUSEN, 2002). Em contraste, infecções com vírus de alto risco (16, 18, 31 e 45), tem sido associado ao desenvolvimento de carcinoma cervical bem como outros genitais malignos (ZUR HAUSEN, 2002; MONSONEGO et al., 2004) e cânceres de cabeça e pescoço (CHEN et al., 2005).

1.4. HPV E CÂNCER ORAL

Dessa forma, o papilomavírus humano (HPV) vem sendo considerado como um dos agentes etiológicos relevantes e associados ao descontrole de ciclo celular no desenvolvimento das lesões bucais. A possível relação do HPV como agente etiológico do câncer oral foi primeiramente relatado por (SYRJANEN et al, 1993). Muitos trabalhos desde então se seguiram e essa associação vem se tornando cada vez mais consistente (MCGLENNEN, 2000; SAND et al., 2000; SCULLY et al., 2000). Uma metanálise realizada entre 1982 à 1997 mostrou que a probabilidade de detecção do HPV em mucosa oral normal foi menos significativa do que em leucoplasias (10%), neoplasia intraepitelial (22,2%), carcinoma verrucoso (26,2%) e carcinoma oral de células escamosas (46,5%), ou seja, a

probabilidade de detecção do HPV em carcinoma oral foi aproximadamente 4.7 vezes maior que em mucosa oral normal (MILLER et al., 2001).

Estudos realizados no Brasil demonstram a presença de HPV em lesões benignas e malignas de mucosa oral com positividade variando de 15 a 60%, sendo que a infecção com HPV oncogênicos, tais como 16 e 18, tem sido descrita em cerca de 20 a 30 % das lesões orais potencialmente malignas e neoplásicas (MIGUEL et al., 1998; SOARES et al., 2002^a; SOARES et al., 2002^b, SOARES et al., 2002^c; GIOVANNELLI et al., 2002; OSTWALD et al., 2003; SUGIYAMA et al., 2003). Lesões malignas ou potencialmente malignas apresentam maior risco de associação com o vírus, o que sugere que o HPV pode estar envolvido no estágio inicial da doença (GIOVANNELLI et al., 2002; RITCHIE et al., 2003; SUGIYAMA et al., 2003).

As proteínas E6 e E7 são capazes de imortalizar células humanas, em grande parte graças à sua capacidade de inativar funcionalmente células supressoras de tumor p53 pela degradação mediada por ubiquitina e proteína reguladora do ciclo celular pRb, respectivamente (ZUR HAUSEN, 2002; HOFFMANN et al., 2004), embora existam evidências de que a atuação de ambas não seja suficiente para os processos de imortalização ou malignização (ZUR HAUSEN, 2000). Estudos com HPVs de alto risco permitiram definir a importância do modo de replicação (integrado ou episossomal) e a função dos genes precoces E6 e E7 nos eventos de proliferação celular (ZUR HAUSEN, 2000). Os produtos dos genes de E6 e E7 dos HPVs de alto risco codificam proteínas multifuncionais que interferem com o crescimento celular, estando diretamente envolvidos nos eventos de transformação celular (ZUR HAUSEN, 2002).

A proteína E6 interage com diversos alvos celulares, interferindo com os processos de proliferação celular, apoptose e transcrição gênica, entre outros. Existem evidências de que E6 ativa a telomerase, a enzima responsável por manter a estrutura telomérica na extremidade dos cromossomos, possivelmente através da ativação do promotor de hTERT por E6 e c-Myc (CHAKRABARTI; KRISHNA, 2003; MCMURRAY; MCCANCE, 2003; VELDMAN et al., 2003). E6 é capaz de associar-se e estimular a degradação com o produto do gene supressor tumoral TP53, uma proteína que exerce papéis fundamentais para a manutenção da estabilidade celular, como controle do ciclo celular e apoptose (LEVINE, 1997; OLIVIER., et al., 2002), mediada por ubiquitinização (CHAKRABARTI; KRISHNA, 2003; TOMMASINO et al., 2003). O gene TP53 contém um polimorfismo nucleotídeo que se liga à Arginina (Arg) ou Prolina (Pro) no códon 72 da proteína p53. Esse polimorfismo parece conferir uma

proteção no desenvolvimento de carcinoma oral de células escamosas (CORTEZZI et al., 2004).

A ligação da proteína de E6 de HPVs de alto risco resulta na degradação da p53, uma proteína supressora de tumor que determina a parada do ciclo celular para o reparo de danos no DNA genômico (HEBNER; LAIMINS et al., 2006). Dessa forma, o complexo gerado por E6/p53 remove o controle p53-dependente do ciclo celular, provocando o aumento de divisão celular, com instabilidade cromossômica e acúmulo de várias mutações na célula infectada (ZUR HAUSEN, 1996). Por outro lado, a ligação da proteína de E6 de HPVs de baixo risco à p53 não resulta em sua degradação e portanto não colabora para os eventos de carcinogênese (LI; COFFINO, 1996; MANTOVANI; BANKS, 2001; SCHEFFNER; WHITAKER, 2003.). E6 ainda é capaz de alterar a transcrição de genes, tanto positiva quanto negativamente. Existem evidências de que E6 inativa CBP (*CREB binding protein*), um regulador transcricional que controla várias respostas celulares, entre elas a ativação do TP53 (ZIMMERMANN et al., 1999; ZIMMERMANN et al., 2000); por outro lado, E6 pode aumentar a expressão de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), contribuindo assim para a angiogênese (LOPEZ OCEJO et al., 2000) em células cancerígenas orais (CHEN et al., 2002). E6 ainda interage com inúmeras outras proteínas celulares, envolvidas com processos de adesão celular (paxilina), contacto celular (PDZ) e sinalização (JAK-STAT), entre outros processos (CHAKRABARTI; KRISHNA, 2003).

A proteína viral E7 tem habilidade de unir-se e inativar os membros da família pRb (pRb, p107 e p130), os quais controlam a progressão do ciclo celular da fase G1 para S através da sua união, na forma hipofosforilada, com membros da família E2F de fatores de transcrição. A degradação da proteína Rb libera E2F para ativar vários genes envolvidos com a síntese de DNA e progressão pelo ciclo celular, sendo que a inibição de pRb por E7 pode induzir uma entrada prematura na fase S do ciclo celular (CHAKRABARTI; KRISHNA, 2003). E7 também se associa com proteínas de complexos de desacetilação de histonas, como Mi2 β e HDAC-1, o que pode levar ao aumento de expressão de proteínas oncogênicas, como cdc25A (uma fosfatase envolvida na ativação de complexos CDK/ciclina) (AVVAKUMOV et al., 2003; BERNAT et al., 2003; HUANG et al., 2002; BREHM et al., 1999; NGUYEN et al., 2002). E7 interage ainda com inúmeros outros alvos dentro da célula hospedeira, como, por exemplo, com fatores de transcrição, entre os quais API (c-jun, JunB, JunD e c-Fos), os quais são essenciais em mediar EFEITOS MITOGÊNICOS E DE DIFERENCIAÇÃO (ANTINORE et al., 1996; CHAKRABARTI; KRISHNA, 2003); com proteínas da maquinaria basal de transcrição, como TAF (*TBP-associated factors*) e TBP (*TATA-box binding protein*),

neste caso inibindo sua ligação ao DNA (ENZENAUER et al., 1998; MALDONADO et al., 2002).

Como exposto acima, as proteínas codificadas pelo vírus HPV oncogênicos induzem a transformação celular através da interação com inúmeras moléculas dentro da célula hospedeira, inclusive alterando a expressão de genes. Possivelmente, os tumores infectados com HPV apresentam um *background* molecular diferente do não infectados, o que pode ser ilustrado pelo fato de que o prognóstico de pacientes com tumores infectados com HPV pode ser diferente dos não-infectados (RITCHIE et al., 2003) e estão relacionadas com características avançadas da doença (SMITH et al., 2004). Já foi demonstrado, por exemplo, que tumores HPV positivos apresentam expressão aumentada dos genes p16/INK4a e PCNA (GONZALEZ MOLES et al., 1996; FREGONESI et al., 2003; SMITH et al 2007), enquanto mutação do gene TP53 é mais freqüente em neoplasias não infectadas pelo vírus (PENHALLOW et al., 1998).

Além da ação das proteínas oncogênicas E6 e E7, as quais inativam proteínas importantes para o controle do ciclo celular e apoptose, entre outros processos (CHAKRABARTI; KRISHNA, 2003; DUENSING; MÜNGER, 2004; HENER; LAIMINS, 2006), a própria inserção do DNA viral na célula hospedeira pode lesar genes fundamentais para a manutenção da estabilidade celular. Existem evidências de que a integração do HPV ocorre em diferentes cromossomos humanos, mas em regiões que contêm genes com alto nível de expressão, as quais, sendo mais descondensadas, seriam mais acessíveis para inserção do DNA viral (CHOO et al., 1996; KLIMOV et al., 2002; THORLAND et al., 2003). Embora a integração possa ocorrer em vários cromossomos, esse processo já foi relacionado com a progressão do estado policlonal para monoclonal em câncer cervical (UEDA et al., 2003). Isto sugere que, durante o processo de integração, genes importantes para a progressão neoplásica podem ser lesados em alguma das células infectadas, conferindo-lhe vantagem de crescimento.

A forma de associação entre o HPV à célula hospedeira determina o potencial oncogênico viral, classificado em baixo risco freqüentes nas lesões benignas e de alto risco nas lesões precursoras, no câncer de colo uterino e de mucosa oral (SAND et al., 2000; HUDELIST et al., 2004). Quando integrado ao genoma da célula hospedeira, a replicação viral ocorre nas células da camada basal, o vírus é distribuído de forma homogênea às células filhas, aumentando do risco de malignização celular. Nas camadas mais diferenciadas do epitélio ocorre a replicação episomal, na qual o DNA viral não se integra, produzindo múltiplas cópias de partículas virais completas. (VILLA, 1997; ZUR HAUSEN, 2000).

Geralmente, o aumento da proliferação está relacionado a lesões mais avançadas e a distribuição das células em proliferação no tecido pode oferecer informações sobre o descontrole do mecanismo regulatório que resulta no processo da carcinogênese (LIU e KLEIN-SZANTO, 2000). Estudos moleculares demonstram que as lesões pré-malignas podem apresentar alterações nos genes RB1, CDKN2A/p16 e TP53 relacionadas com o potencial maligno destas lesões (PANDE et al., 1998; QIN et al., 1999; OGMUNDSDOTTIR et al., 2002; KOVESI e SZENDE, 2003). Ainda, em neoplasias orais, já serão descritas alterações em genes envolvidos no reparo do DNA, como XRCC1 (NER, *nucleotide excision repair*), KU 70/80 (NHEJ, *nonhomologous end-joining*) e hMSH2 e hMLH1 (MMR, *mismatch repair*) (LO MUZIO et al., 2000; STURGIS et al., 2000; KORABIOWSKA et al., 2002; HSIEH et al., 2003).

Os danos produzidos no material genético devem ser sinalizados e corrigidos, e por isso são ativados mecanismos de controle da progressão pelo ciclo celular – os *checkpoints* – quando as condições internas são desfavoráveis à divisão celular (Figura 2). Esses *checkpoints* atuam sobre as ciclinas e as CDKs (*cyclin-dependent kinases*), as moléculas que coordenam a sucessão de eventos que ocorrem em cada fase do ciclo celular, controlando a progressão pelo ciclo celular (YOO et al., 2002). Além de controlar o bloqueio ou retardo no ciclo celular, os *checkpoints* fazem parte de uma ampla rede de resposta ao dano, que pode incluir a ativação de mecanismos de reparo, ativação transcricional e apoptose, esta última nos casos onde a extensão do dano impossibilitar a sua correção (ZHOU; ELLEDGE, 2000).

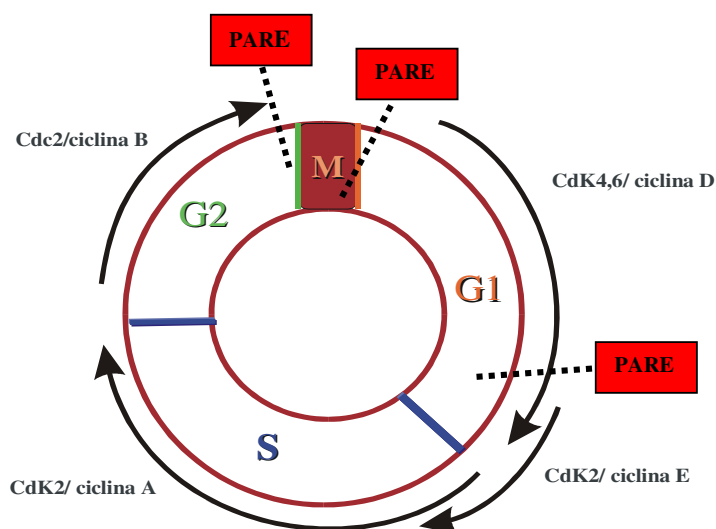


Figura 2- Representação esquemática do complexo ciclina/CDK nas diferentes fases do ciclo celular e *checkpoints* nas fases G1, G2 e M. Fonte: Extraído de Cooper, 2000.

As proteínas inibitórias de ciclinas dependentes de kinase (CKI) auxiliam a modulação do ciclo celular permitindo a interrupção de determinada fase do ciclo e garantindo que eventuais danos genéticos sejam corrigidos. Dentre as proteínas do grupo das CKI, a p27 (Figura 3) pertence à família CIP/KIP, cuja função é inibir principalmente CDK4 e CDK 2 (COQUERET, 2000). A proteína p27, cuja função é interagir com o complexo ciclina/CDK, inibindo CDK4 e CDK2, interrompendo a progressão do ciclo celular exerce papel de supressora de tumor (BLOOM e PAGANO, 2003; CHETTY 2002).

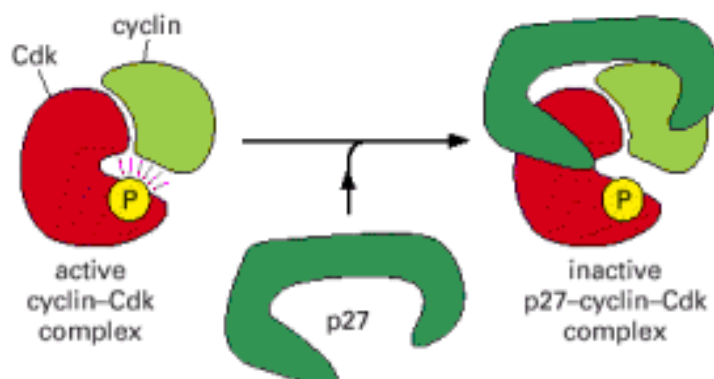


Figura 3 - Representação esquemática da inativação do complexo ciclina/CDK pela p27. Fonte: Extraído de Alberts et al. 2002.

Nas neoplasias o complexo protéico ciclina/CDK e as proteínas inibidoras de CDK (CKI) têm suas funções desreguladas ou perdidas, e por isso o controle do ciclo celular fica prejudicado. A desregulação desses eventos celulares, tanto os responsáveis pela ativação dos *checkpoints* quanto os envolvidos no mecanismo de apoptose, podem favorecer a perpetuação de alterações que podem contribuir para a transformação maligna. Alterações em genes de mecanismos de reparo do DNA também podem contribuir para o processo de malignização. Altos níveis de p27 são encontrados em tecidos normais e lesões benignas e a alta expressão relacionada à indução da apoptose (PATAH et al., 2004; COQUERET, 2003). Entretanto, sua expressão está diminuída em alguns tumores, incluindo os de mucosa oral (HWANG et al., 2003; KUROPKAT et al., 2002). Nos carcinomas cervicais a baixa expressão de p27 tem sido relacionada com infecção por HPV (KIM et al., 2000), embora essa associação na mucosa bucal seja pouco estudada.

Há dois tipos de atividade da proteína p53 dependendo de seu nível: quando o nível está baixo, a p53 ativa a transcrição de genes de reparo do ciclo celular “checkpoints” induzido por um dano no DNA; quando o nível de p53 está alto, esta proteína ativa transcrição de genes para apoptose (MIHALAS et al., 2006).

Existe uma relação recíproca entre p53 e mdm2: p53 estimula transcrição de gene mdm2 promovendo a síntese desta proteína; por outro lado, através do domínio RING na porção C-terminal, a proteína mdm2 ubiquitina p53 e estimula sua degradação (MIHALAS et al., 2006).

A proteína mdm2 (Figura 4) tem função de ubiquitina ligase encaminhando p53 para a degradação proteassômica no citoplasma (LEVAV-COHEN et al., 2005; SOUZA et al., 2000; FREEDMAN; LEVINE, 1998).

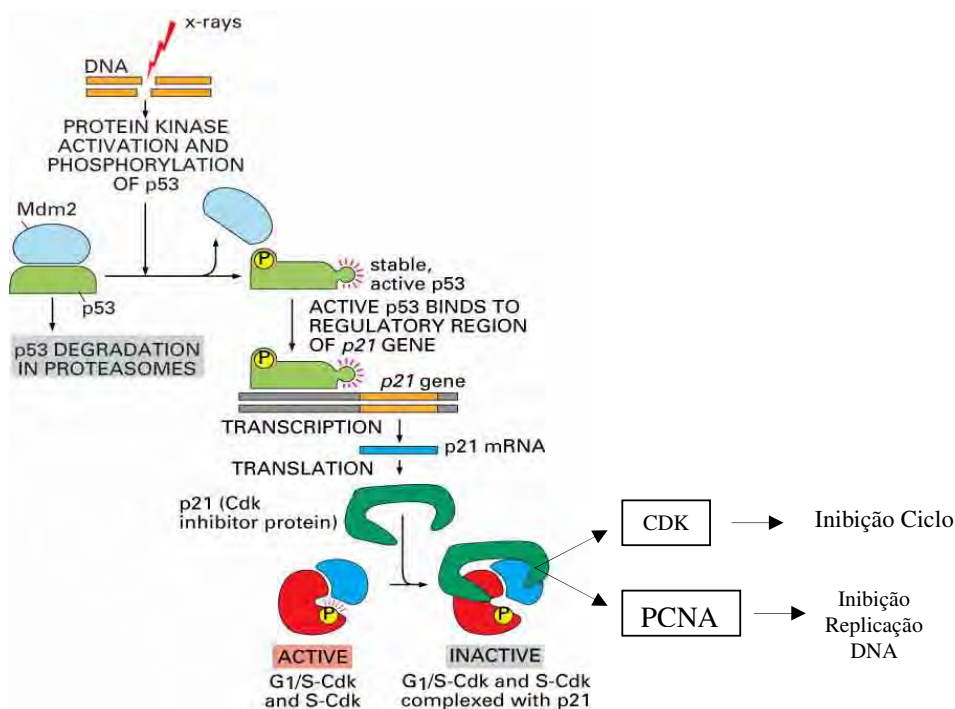


Figura 4 – Representação esquemática da função da proteína mdm2 de ubiquitina ligase encaminhando p53 para a degradação proteossômica no citoplasma. Fonte: Modificado de Alberts et al. 2002.

O mdm2 é um oncogene que se apresenta alta expressão uma variedade de tumores. Recentes estudos têm demonstrado que mdm2 possui capacidade de se ligar diretamente a p53 e direcionar essa proteína para a degradação proteossômica, funcionando como uma ubiquitina ligase (HONDA et al., 1997; NAKAMURA et al., 2002; CAMUS et al., 2003). A ligação mdm2/p53 expõe um sinal de localização nuclear (NLS) existente na proteína mdm2, permitindo o reconhecimento deste complexo protéico para exportação do núcleo para o citoplasma. No citoplasma o complexo mdm2/p53 é encaminhado para um complexo proteossômico, onde a proteína p53 é degradada e mdm2 fica livre para ser importada novamente para o núcleo (FREEDMAN; LEVINE, 1998; LI et al., 2003). Assim, o controle de função de p53 é dependente dos estoques de mdm2 e, portanto, a superexpressão desta proteína poderá acarretar a perda de controle de ciclo celular na G1/S, contribuindo para a transformação maligna celular (MENDHELSON et al., 2001).

A cathepsina B é uma cisteíno-proteinase lisossomal, produto do gene 8p22a, com atividade endopeptidásica, na sua forma pré-pró-enzima. (NÄGLER et al., 1997; PODGORSKI; SLOANE, 2003; YAN; SLOANE, 2003). Tem função nos processos

fisiopatológicos (Figura 5) de *turnover* da matriz extracelular e na tumorigênese, a catepsina B ativa metaloproteinase (MMPs), e com isso, há um aumento da transdução de sinal e liberação de fator de crescimento de vasos (VEGF) resultando em angiogênese. Além disso, aumenta liberação de fatores de crescimento tumoral β e de moléculas de adesão, favorecendo à metástase (MIGNATTI; RIFKIN, 1996; RAO, 2003).

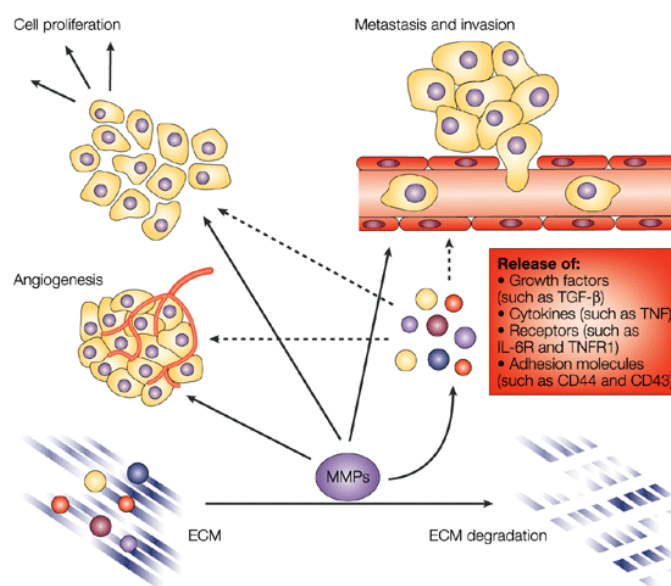


Figura 5 – Representação esquemática da função da catepsina B. Fonte: Extraído de Rao, 2003.

A elevação de sua atividade é observada em alguns tumores, localizada na membrana plasmática das células tumorais para garantir a degradação da matriz extracelular e lâmina basal nos processos de invasão (TALIERI et al., 2004; MOIN et al., 1998; GUINEC et al., 1992). Além disso, a catepsina B é frequentemente superexpressa em vários tumores, incluindo carcinoma oral de células escamosas comparado em tumores benignos ou tecidos normais (VIGNESWARAN et al., 2000).

Investigações clínicas têm mostrado que a catepsina B é um indicador altamente confiável para o diagnóstico e prognóstico, estando relacionado às lesões altamente invasivas e com capacidade metastática no câncer oral. (VIGNESWARAN et al., 2000). Por outro lado, o aumento da expressão de catepsina B em lesões pré-malignas sugere que essa enzima participe no processo de transformação maligna das lesões precursoras em tumores

(SKRZYDLEWSKA et al., 2005). A catepsina B parece possuir atividade de protease ativadora de morte celular dependente e independente de caspases, disparando sinal alternativo de apoptose em células tumorais. (KAZNELSON et al., 2004; FU et al., 1998). Assim, é possível que o HPV possa interferir na sua ativação, impedindo a apoptose e garantindo a transformação maligna celular. Entretanto, apenas um único estudo encontrado na literatura avalia o envolvimento do HPV na função da catepsina B (KAZNELSON et al., 2004), e nem este ou os demais estudos com catepsina B foram realizados em lesões orais associadas à infecção pelo HPV. De fato, o HPV parece atuar no descontrole destas proteínas, embora, segundo nosso conhecimento, nenhum estudo tenha avaliado a expressão das proteínas mdm2, p27 e catepsina B com a infecção por HPV em lesões orais.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve por objetivo avaliar a associação entre a presença do HPV, o câncer oral e o descontrole eventual de proteínas relacionadas com o controle do ciclo celular.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a frequência de HPV 6, 11, 16, 18, 31 e 33 entre lesões de cavidade oral estratificadas segundo o diagnóstico histológico.
2. Verificar a expressão imunohistoquímica das proteínas p27, mdm2 e catepsina B em lesões de cavidade oral, na presença ou ausência do HPV.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Cinquenta e cinco biópsias de mucosa oral, fixadas em formalina tamponada e incluídas em parafina, foram selecionadas dos arquivos do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP) e dos arquivos do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). O estudo contou com a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas de Seres Humanos (Comitê de Ética HCFMRP processo nº10108/2004). As biópsias foram selecionadas a partir do diagnóstico histológico dos cortes corados pela hematoxilina/eosina e as lesões foram classificadas de acordo com critérios histopatológicos propostos por VAN DER WAAL et al, 2000. A avaliação histológica das lesões foi realizada por dois patologistas experientes da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP) e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). As lesões foram estratificadas em grupos denominados de lesões benignas - LB, lesões epiteliais potencialmente malignas - LEPM e lesões malignas - LM (carcinoma oral). Cortes histológicos de 4µm foram colocados em lâminas previamente silanizadas com organossilano 4 % em acetona (3-aminopropil trietoxissilano – SIGMA, St. Louis, USA) para a realização das reações de imunohistoquímica. Ainda, de cada grupo foram realizados cortes de 15µm, colocados em *eppendorf* estéril e submetidos aos procedimentos de extração e amplificação por PCR para a detecção e identificação dos tipos de HPV.

3.2. METODOLOGIAS

3.2.1. Reação de Imunohistoquímica (*p27*, *mdm2* e *cathepsina B*).

As lâminas foram submetidas a banhos consecutivos em baterias de xilol e álcool (Synth–Diadema, SP) para a completa desparafinização. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada tratando as lâminas com 2 banhos consecutivos de peróxido de hidrogênio 3% em metanol (v/v), por 15 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, para a recuperação antigênica, os cortes foram submetidos à fervura em panela à vapor *steam-cuisine* (T-FAL, Industria de Aparelhos Médicos LTDA) imersos em solução de citrato 10mM/pH6,0 (Synth - Diadema, SP), durante 70 minutos, a 95°C. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos cada lavagem. A seguir, para o bloqueio de reações inespecíficas, as lâminas foram lavadas em PBS por três vezes, 5 minutos cada, e incubadas

com leite desnatado 1% por 40 minutos. A diluição dos anticorpos foi estabelecida através de avaliação da positividade em lâmina sabidamente positiva com diferentes concentrações para determinação de melhor título dos anticorpos p27, mdm2 e catepsina B. Deste modo, as lâminas foram, novamente, lavadas em PBS e adicionado sobre os cortes o anticorpo primário monoclonal anti-mdm2 (DAKO, Glostrup, Dinamarca) e monoclonal anti-p27 (DAKO) e policlonal anti-catepsina B (Calbiochem, Darmstadt, Germany). As lâminas foram incubadas a temperatura ambiente, *overnight* em câmara úmida. Decorrido o período de incubação, as lâminas foram submetidas à lavagem com PBS e incubadas com o anticorpo secundário, biotilado anti-cabra, coelho e camundongo produzido em porco (LSAB, DAKO) em câmara úmida por 30 minutos à 37°C. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos cada lavagem, e incubadas com complexo Streptavidina- Biotina - Peroxidase (LSAB, DAKO, Glostrup, Dinamarca), em câmara úmida por 30 minutos, à 37°C. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS, e a reação revelada com incubação dos cortes em solução de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio à 37°C, por cinco minutos. Após a incubação, as lâminas foram lavadas em água corrente, contra coradas com hematoxilina de Carrazi por 60 segundos, lavadas novamente em água corrente, desidratadas em baterias de álcool e xilol e montadas em Permount (Fisher Scientific, CA,USA).

3.2.1.1. Controles

Para controle positivo do marcador mdm2 serão utilizados cortes histológicos de carcinoma ductal invasivo de mama, para o p27, foi utilizado como controle positivo tonsilas humanas e para a catepsina B carcinoma de cólon. O controle negativo para ambos os marcadores serão os mesmos cortes histológicos utilizados no controle positivo, subtraindo-se a etapa de incubação com o anticorpo primário.

3.2.2. Captura e Análise de Imagem

Os núcleos (p27) ou citoplasma (mdm2 e catepsina B) positivos foram automaticamente quantificados pelo equipamento Image-Pro Plus (Cybernetics, MD, EUA) o qual inclui um microscópio, uma câmera digital e um software para análise de imagem. A média de oito campos randomicos do microscópio foi selecionada para a análise de 1000 células marcadas (núcleo ou citoplasma) por biópsia em todos os pacientes. A aquisição da

imagem das lâminas dos 55 pacientes com lesões de cavidade oral foi realizada na fotomicrografia e a imagem processada pelo software. Cada lâmina foi digitalizada e a segmentação foi controlada interativamente pelo filtro RGB existente no programa de análise de imagem. A contagem automática das células positivas foi estabelecida e expressa em porcentagem.

3.2.3. Quantificação Interobservador

A expressão imunohistoquímica de p27, mdm2 e catepsina B foi quantificada manualmente em microscópio ótico por dois observadores e o desempate de um terceiro observador nos casos de resultados discordantes além de 10%. Em cada marcador (p27, mdm2 e catepsina B) as células marcadas foram quantificadas no total de 1000 células por biópsia e a quantificação foi expressa em porcentagem.

3.2.4. Interpretação

A expressão quantitativa de p27, mdm2 e catepsina B foi classificada, em índices de positividade (IP) 1 (negativo a 30% de positividade), 2 (31 a 60%) e 3 (61 a 69.1%), de modificadas de Millon et al (2001); Kos e Lah, (1998). Ainda, a expressão de todas as proteínas foi avaliada segundo a intensidade e distribuição tecidual da coloração.

3.3. Detecção e tipagem do HPV

3.3.1. Extração de DNA genômico de tecido parafinado

Para a extração do DNA de tecido parafinado foram utilizados dois cortes histológicos com espessura de 10 µm e, a extração foi realizada segundo proposto por Sato et al (2001) e modificado neste estudo. Os cortes histológicos transferidos para eppendorfs estéreis, adicionado 1000µL de xilol absoluto em cada tubo. O tecido parafinado contendo xilol foi homogeneizado por inversão e incubado em Banho Maria a 65°C, por 10 minutos, seguido de centrifugação 6000 rpm, 4°C por 2 minutos. O sobrenadante é descartado e esse procedimento foi repetido por 4 a 5 vezes para retirada completa da parafina. Na última centrifugação, o sobrenadante foi removido, adicionando 700µL de xilol absoluto e 300µL de etanol absoluto, e em seguida a amostra é homogeneizada, centrifugado 6000 rpm, 4°C por 2 minutos e novamente o sobrenadante é descartado. Em seguida, foi adicionado ao sedimento,

500 µL de xilol e 500µL de etanol absoluto, seguido de centrifugação e descarte do sobrenadante. Novamente, foi adicionado 300µL de xilol e 700µL de etanol absoluto. Na seqüência, 1000µL de etanol absoluto foi acrescido ao sedimento, centrifugando e novamente descartando o sobrenadante. No sedimento obtido foi adicionado 1000µL de tampão de lise Tris-HCL 10Mm, pH 8,5 (2,5mM MgCl₂, 50mM KCl, Nonidet P-40 1% e Tween1%). Em seguida os tubos foram homogeneizados, centrifugados a 6000 rpm, por 2 minutos e o sobrenadante descartado. Novamente, o sedimento obtido foi ressuspendido com 1000µL de tampão de lise Tris-HCl 10mM (pH 8,5) e 10µl de proteinase K (10mg/mL) e incubado em Banho Maria a 65°C por 2horas. Após o período de incubação, os tubos foram submetidos a temperatura de 94°C por 10 minutos objetivando a inativação da proteinase K. O DNA extraído foi acondicionado a -20°C até o momento dos experimentos de amplificação para a detecção do HPV.

3.3.1.1. Amplificação do HPV (região consenso) e de beta globina

Após a extração, o DNA obtido dos tecidos parafinados foi submetido a amplificação pela reação da polimerase em cadeia (PCR) para verificar a presença de DNA (gene da Beta-globina) nas amostras e para detectar e tipificar e HPV (GP5+/6+ e HPV tipo específico). Considerando que os DNA extraídos de tecidos fixados e incluídos em parafina apresentam-se fragmentados, a estratégia de amplificação deve considerar a utilização de iniciadores para fragmentos de DNA com no máximo 200 pares de base (pb). Todas as reações foram realizadas no termociclador Biocycler.

A amplificação do gene da beta-globina (β-globina) foi utilizada para avaliar a integridade do DNA genômico pós-extração, e como um controle interno da amplificação. Os iniciadores aqui utilizados (PCO3 e PCO4) gene (PCO3+ CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC e PCO4+ TCA CCA CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC) amplificam um fragmento de 100 pares de base (pb). A reação de PCR foi realizada sob as seguintes condições: 0,20mM de dNTP, 0,1uM de cada iniciador, 1.25U/uL de Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão de PCR 1X (Invitrogen), 2µg de DNA genômico, e água destilada deionizada para um volume final de 25 µL. Os ciclos da reação foram estabelecidos segundo (WALBOOMERS et al., 1999) e modificados posteriormente nas etapas de padronização A mistura de reação foi amplificada pelo programa de 1 ciclo de 94°C por 7 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1minuto, 55°C por 1minuto e 72°C por 1 minuto e 1 ciclo de 72°C por 10 minutos.

Para detectar a presença do DNA do HPV nas amostras analisadas, foram utilizados os iniciadores GP5+ e GP6+(MANOS et al., 1989) que amplificam um fragmento de 142 pb da região L1 comum a todos os tipos de HPV. A reação de PCR foi realizada o protocolo modificado de (BETTINI et al., 2003), utilizando-se 0,20mM de dNTP, 0,60uM de cada iniciador, 1,25U/uL Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão de PCR 1,4 x (Invitrogen), 2µg de DNA genômico e água deionizada para um volume final de 25 µL. O DNA das amostras foi amplificado em termociclador de acordo com as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos, 37 ciclos de 94°C por 30 segundos, 45°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e finalmente 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. Como a quantidade de DNA viral presente na amostra é pouca em relação ao DNA humano e qualidade do DNA extraído de fragmentos parafinizados com xilol e álcool é baixa, foram necessárias 2 reações de PCR (nested PCR) sob as mesmas condições de primeira para permitir a visualização dos produtos amplificados nos géis de poliacrilamida 10%. A segunda PCR foi realizada sob as mesmas condições de primeira, substituindo-se o DNA genômico por 1µL de DNA amplificado na primeira reação.

A tipagem dos HPVs 6, 11, 16, 18, 31 e 33 foi realizada em todas as amostras positivas para GP5+/GP6+, segundo protocolo descrito e modificado por (WALBOOMERS et al., 1999). Para os procedimentos de amplificação e identificação dos tipos de HPV um volume final de reação de 25 µl foi utilizado, numa mistura da reação incluía 20 ng de DNA genômico, 0,020 mM de deoxinucleosideo trifosfato (Pharmacia, Uppsala, Sweden) ,0.6 µM de primer (IDT, IA, USA), 1,25 U *Taq* polimerase, 3 mM MgCl₂, e 1x buffer (Invitrogen, Brazil). As condições dos ciclos de amplificação foram: desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, e 72°C por 1 minuto e a extensão por 1 ciclo de 72 °C por 10 minutos. Para a amplificação do HPV11 a temperatura de anelamento utilizada foi de 60°C.

A observação de todos os produtos amplificados fora feita em gel de poliacrilamida 10%, submetido a eletroforese a 250 volts por 1 hora e 30 minutos e corados com nitrato de prata (SANGUINETI, 1994).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise quantitativa da expressão das proteínas p27, mdm2 e catepsina B entre as lesões estratificadas de acordo com o diagnóstico histológico, foi utilizado o Teste de One Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni. Para a avaliação de presença do HPV entre os grupos de lesões de cavidade oral, estratificadas segundo o diagnóstico histológico, foi utilizado o Teste Exato de Fisher. Para a comparação entre a expressão quantitativa p27, mdm2 e catepsina B e a presença ou ausência do HPV foi aplicado o Teste Z. O teste One Way ANOVA com pós-teste de Bonferroni foi aplicado para análise comparativa entre os índices de positividade obtidos da expressão quantitativa das proteínas p27, mdm2 e catepsina B entre as lesões de cavidade oral. O Teste T não pareado foi aplicado na comparação entre a avaliação quantitativa por análise de imagem e contagem interobservador. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de ≤ 0.05 . Todos os resultados foram avaliados pelo programa InStat Mac 2.01 (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados nas Tabelas 1 a 5 e Figuras 6 a 9. De acordo com o diagnóstico histológico, entre os 55 pacientes avaliados, 18(33%) apresentaram lesões benignas (LB), 18(33%) lesões potencialmente malignas (LPM) e 19(35%) de lesões malignas (LM). Na avaliação da presença do HPV entre os 55 pacientes (Tabela 1, Figura 6), 21(38%) foram positivos para a presença de HPV e 34 (62%) foram HPV negativos (Tabela 1). Nos 18 pacientes pertencentes ao grupo de lesões benignas (LB), o DNA dos tipos de HPV 6/11 foi encontrado em 6(33%) pacientes com (LB). O tipo de HPV 16 foi encontrado em 1(20%) dos 19 pacientes com (LM) e o HPV18 foi identificado em 4(22%) dos 18 pacientes com (LPM) e 10(53%) dos 19 pacientes com (LM). Nenhuma lesão foi simultaneamente positiva para os tipos de HPV 6/11, 16 e 18. Ainda, nenhuma lesão oral foi positiva para os tipos de HPV 31 e 33. Estes resultados demonstram uma associação significativa ($P<0.0001$) entre a infecção pelos tipos de HPV de alto risco e as lesões epiteliais potencialmente malignas e malignas de mucosa oral.

Tabela 1. Tipificação do Papilomavírus humano (HPV) em 55 lesões de cavidade oral, estratificadas de acordo com o diagnóstico histológico.

	HPV (+)	HPV 6/11	HPV 16/18	HPV (-)
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
LB (n=18)	6(33)	6 (33)	0	12 (66)
LPM (n=18)	4 (22)	0	4 (22)	14 (77)
LM (n=19)	11(58)	0	11 (58)	8 (42)
Total (n=55)	21 (38)	6 (11)	15 (27)	34 (62)

Lesão Benigna (LB); Lesão potencialmente maligna (LPM); Lesão Maligna (LM) = Carcinoma oral. HPV 31 e 33 não foram detectados em lesão orais. Teste Exato de Fisher, $P<0.0001$.

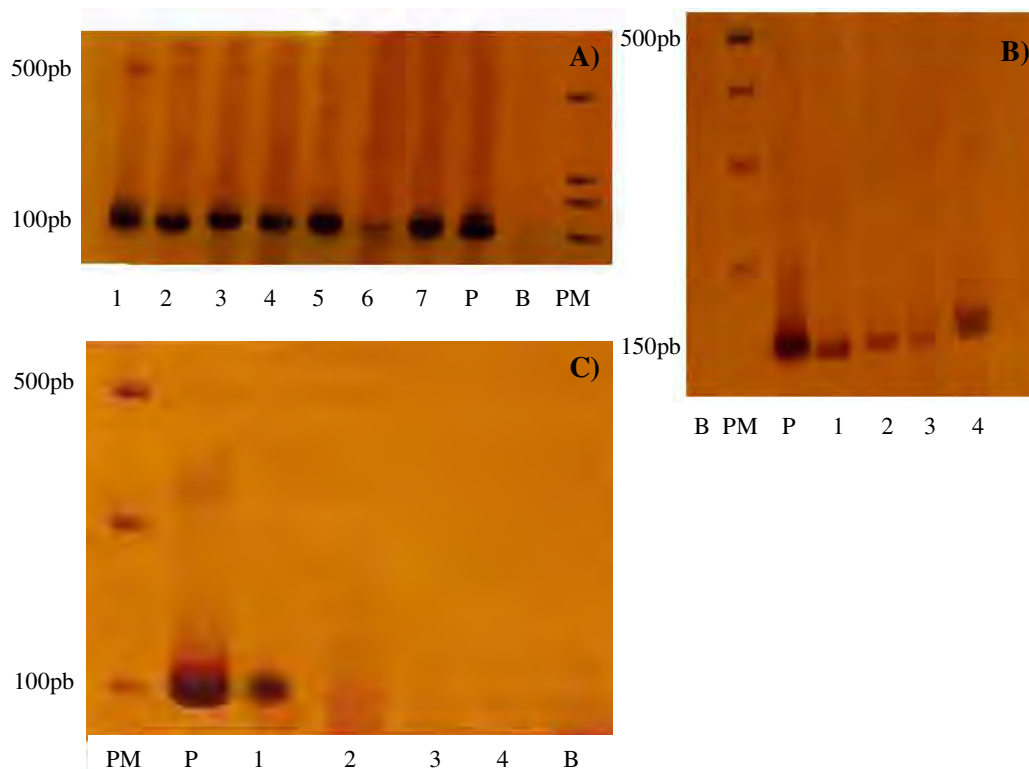


Figura 6 - Reação de polimerização em cadeia (PCR) em gel de poliacrilamida 10%. A) Reação de amplificação do gene de beta globina e amplificado com banda de 100pb; B) Amplificação de DNA de HPV utilizando primers de região consenso (GP5+/ 6+); Canaletas 1, 2, 3,4 = pacientes HPV positivo; C) Identificação de HPV 11, utilizando primers específicos; Canaletas 1 = paciente positivo para a presença do HPV11; PM = Massa molecular de 100pb; P = Controle positivo com banda de 100 pb referente a amplificação de DNA de HPV 11 extraído de células HeLa; B = Controle negativo, sem DNA.

A expressão imunohistoquímica quantitativa das proteínas p27, mdm2 e catepsina B em biópsias de mucosa oral estratificadas de acordo com a infecção pelo HPV demonstrou um aumento na expressão destas em lesões de mucosa oral infectados com HPV (Tabela 2). Aumento na expressão de p27 foi observado em lesões infectadas com HPV6 e 11 ($P = 0.0035$) e HPV 16 e 18 ($P = 0.0001$) enquanto para catepsina B o aumento da expressão foi observado somente em lesões com presença de HPV 16 e 18 ($P = 0,0388$). Não foi encontrada associação entre a expressão de mdm2 e a infecção pelos tipos de HPV 6,11, 16 ou 18. Lesões

de mucosa oral infectadas com HPV 18 apresentaram coloração intensa e distribuída difusamente para todas as proteínas avaliadas nesse estudo (Figura 7 a 9).

Tabela 2. Expressão quantitativa de p27, mdm2 e catepsina B lesões orais infectadas por HPV.

	p27 ^(a)	mdm2	Catepsina B ^(b)	Total
	M ± EP	M ± EP	M ± EP	
Negativo	27,2 ± 1.5	20,4 ± 2.2	26,5 ± 4.2	34
HPV 6/11	53,9 ± 6,4	23,3 ± 5,6	31,2 ± 1,6	6
HPV 16/18	39,4 ± 4,0	23,3 ± 3,9	44,6 ± 5,5	15
Total				55

Teste Z: ^(a) p27 = HPV negativo *versus* HPV 6/11 (P=0,0035); HPV 6/11 *versus* HPV16/18 (P = 0,0001); ^(b) catepsina B = HPV negativo *versus* HPV16/18 (P= 0,0388). M ± EP = Média e Erro Padrão.

A comparação entre todos os resultados da expressão quantitativa de p27, mdm2 e catepsina B e as lesões de cavidade oral (Tabela 3) não demonstrou diferença entre os grupos (p27, P = 0.7392, mdm2, P= 0.2142 e catepsina B, P = 0.1047). Diferença significativa foi observada na quantificação por análise de imagem (IM) e interobservador (IO) das proteínas p27, mdm2 e catepsina B entre as lesões (Tabela 3). Essa diferença foi menor para a p27 (P = 0.0013) e expressivamente maior para mdm2 (P<0,0001) e catepsina B (P<0.0001). Aparentemente a marcação de mdm2 (Figura 8 C a F) e de catepsina B (Figura 9 A a D), seria mais difícil de interpretar, principalmente por análise de imagem, cuja característica da imunocoloração (citoplasmática, intensa e difusa) parece ser um fator limitante na interpretação especialmente nas lesões epiteliais potencialmente malignas e malignas.

Tabela 3 – Média e Erro Padrão (M ± EP) da expressão imunohistoquímica quantitativa de p27, mdm2 e catepsina B por análise de imagem (IM) e análise interobservador (IO).

	p27 ^(a,d)		mdm2 ^(b,e)		catepsina B ^(c,f)	
	IM	IO	IM	IO	IM	IO
	M ± EP	M ± EP	M ± EP	M ± EP	M ± EP	M ± EP
LB (n=18)	46,0 ± 5,6	37,0 ± 5,1	64,5 ± 8,1	18,6 ± 3,0	86,8 ± 1,7	29,8 ± 2,1
LPM (n=18)	51,0 ± 7,0	39,0 ± 5,1	70,2 ± 9,5	44,3 ± 4,1	74,2 ± 7,8	43,4 ± 4,9
LM (n=19)	60,3 ± 9,0	38,7 ± 4,1	69,0 ± 9,1	24,5 ± 3,5	88,7 ± 7,2	36,7 ± 3,9

Comparação entre IM versus IO - Teste T não pareado: (a) p27 (P = 0,0013); (b) mdm2 (P < 0,0001); (c) catepsina B (P < 0,0001). One Way ANOVA: Expressão de p27, mdm2 e catepsina B (IO) versus lesões^(d) p27 (P=0.7392);^(e) mdm2 (P = 0.2142);^(f) catepsina B (P = 0.1047).

Entretanto, quando a expressão das proteínas em relação às lesões de cavidade oral foi avaliada através da classificação por índice de positividade (IP), foi observada associação significativa para a expressão de p27, mdm2 e catepsina B (Tabela 4). Esses resultados sugerem que a avaliação da positividade dessas proteínas, descontada a positividade normal esperada (*cut off*), permite boa discriminação entre os grupos de lesões benigna, potencialmente maligna e maligna.

Tabela 4. Índice de positividade (IP) de p27, mdm2 e catepsina B: imunopositividade quantitativa em lesões orais, de acordo com o diagnóstico histológico.

Lesões	p27 ^(a)			mdm2 ^(b)			Catepsina B ^(c)			TOTAL
	IP1	IP2	IP3	IP1	IP2	IP3	IP1	IP2	IP3	
LB	8	8	2	16	2	0	6	12	0	18
LPM	4	12	2	10	8	0	3	11	4	18
LM	6	12	1	12	6	1	8	8	3	19
TOTAL										55

One Way ANOVA: ^(a) p27 (P= 0.0033) = IP1 *versus* IP2 (p<0,05), IP1 *versus* IP3 (p<0,05), IP2 *versus* IP3 (p<0,05); ^(b) mdm2 (0.0035) = IP1 *versus* IP2 (p<0,05), IP1 *versus* IP3 (p<0,01), IP2 *versus* IP3 (p<0,05); ^(c) catepsina B (P = 0,0202) = IP1 *versus* IP2 (p<0,05); IP1 *versus* IP3 (p<0,05), IP2 *versus* IP3 (p<0,05). Lesão Benigna (LB); Lesão Potencialmente Maligna (LPM); Lesão Maligna (LM) = Carcinoma oral. IP: IP1 (negativo a 30%), IP2 (>30% a 60%) e IP3 (61% a 69%).

Para mdm2 e catepsina B, foi observada alta intensidade de coloração e distribuição tecidual difusa (Figura 7 e 8) de acordo com o diagnóstico histológico. A expressão de p27 foi maior nas leucoplasias (Figura 7F e G) e no carcinoma (Figura 7H), enquanto nas lesões benignas foi observado um padrão de marcação discreto e distribuído esporadicamente na camada basal (Figura 7D, 8D e 9A). A maior expressão de p27 foi observada nas lesões potencialmente malignas e no carcinoma oral, respectivamente, no núcleo das células pertencentes a camada basal do epitélio. Esses resultados demonstram uma forte associação entre o aumento de expressão de p27, mdm2 e catepsina B em lesões malignas ou com elevado potencial de malignização, sugerindo que a avaliação da expressão imunohistoquímica das proteínas p27 e catepsina B poderia ser um bom marcador do câncer oral associado à infecção pelo HPV.

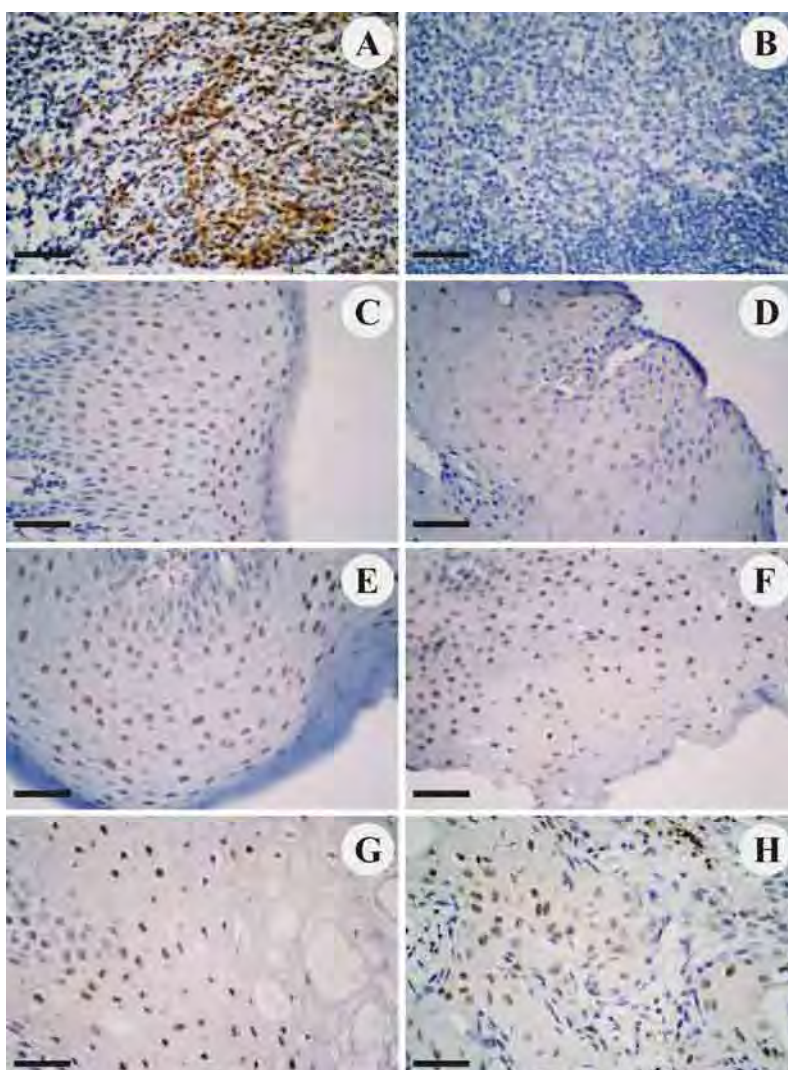


Figura 7 – Imunoperoxidase para p27 em lesões orais. A) Controle positivo (Tonsila). B) Controle negativo (Tonsila). C) Controle Normal de mucosa oral. D) Lesão oral benigna com positividade camada basal e intermediária. E) Lesão oral benigna com mesma marcação vista em D. F) Lesão Potencialmente Maligna com marcação em todas as camadas de basal a superficial. G) Lesão Potencialmente Maligna com marcação nas áreas de atipia. H) Lesão Maligna (Carcinoma oral) com intensa e difusa marcação em toda área neoplásica. Barra de escala igual a 250 μ m.

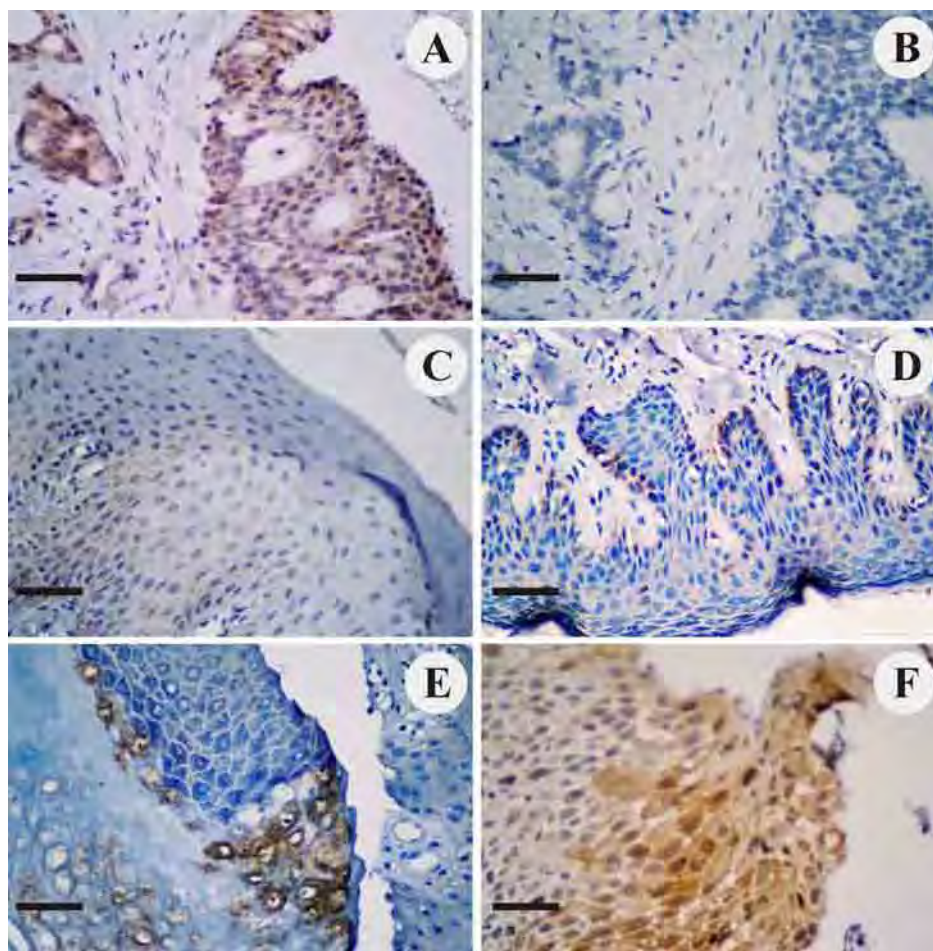


Figura 8 – Imunoperoxidase para mdm2 em lesões orais. A) Controle positivo (Carcinoma ductal invasivo de mama). B) Controle negativo (Carcinoma ductal invasivo de mama). C) Controle Normal. D) Lesão oral benigna com positividade somente na camada basal. E) Lesão Potencialmente Maligna com marcação intensa nas áreas de atipia. F) Lesão Maligna (Carcinoma oral) com intensa e difusa marcação em toda área neoplásica. Barra de escala igual a 250 μ m.

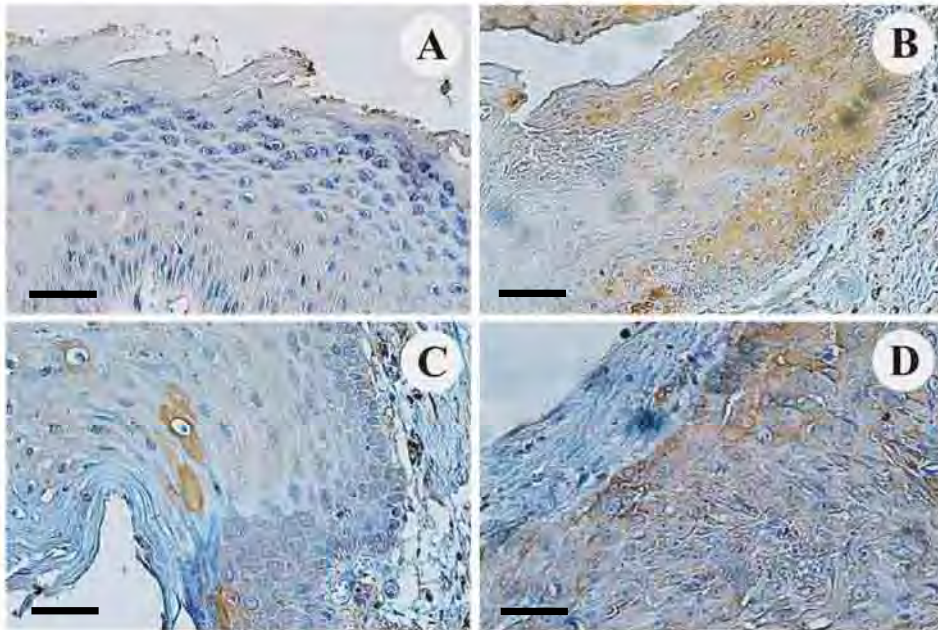


Figura 9 – Imunoperoxidase para catepsina B em lesões orais. A). Lesão oral benigna com positividade citoplasmática discreta na camada basal e intermediária. B) e C) Lesão Potencialmente Maligna com marcação citoplasmática intensa e difusa nas áreas de atipia. D) Lesão Maligna (Carcinoma oral) com intensa e difusa marcação em toda área neoplásica. Barra de escala igual a 250 μ m.

6. DISCUSSÃO

O câncer de cabeça e pescoço inclui de lábio, cavidade oral, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe, laringe e glândulas salivares. A carcinogênese de mucosa oral é classicamente atribuída ao fumo e álcool. O hábito de fumar e a ingestão regular de álcool parecem estar diretamente relacionados ao desenvolvimento desse tipo de carcinoma (SARANATH et al., 1999; WEINBERG; ESTEFAN, 2002). Nessas localidades, principalmente na laringe, há evidências da presença do papilomavírus humano (HPV) (SYRJÄNEN, 2005). Entre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer oral, o HPV vem sendo considerado como um dos agentes etiológicos relevantes e associados ao descontrole de ciclo celular no desenvolvimento das lesões bucais.

Entretanto, estudos prévios demonstram variada frequência de HPV entre as lesões de cavidade oral (FORNATORA et al. 1996; D' COSTA et al. 1998; MIGUEL et al. 1998, FREGONESI et.al, 2003), com uma prevalência média de 20 a 30% (MILLER; JOHNSTONE 2001; SOARES et al. 2003) e elevada positividade dos tipos de HPV de alto risco (50%) nas lesões orais (MILLER; WHITE 1996; SOARES et al, 2002; FREGONESI et al, 2003). Os resultados do presente estudo demonstram uma forte associação entre a presença dos tipos de HPV de alto risco e o carcinoma espinocelular, indicando que o HPV poderia ser considerado um dos fatores de risco para a carcinogênese de cavidade oral. Ainda, no presente estudo, foi observada associação positiva entre a presença do HPV 6 e 11 e lesões orais benignas cujo prognóstico de sobrevida é geralmente benigno. A presença dos tipos de HPV de baixo risco em lesões benignas parece indicar um prognóstico mais favorável (PAPAROTTO LOPES; MEEKS 2001). O HPV 6, baixo risco, é raramente encontrado em tumores malignos, embora, HPV6/11 têm sido ocasionalmente encontrados em carcinomas vulvar, cervicais e papilomas de laringe em transição maligna e condilomas gigantes (SYRJÄNEN; SYRJÄNEN, 2000).

Algumas das oncoproteínas do HPV são capazes de interagir com várias proteínas da célula hospedeira, interferindo com processos como controle do ciclo celular, resposta apoptótica, sinalização celular e expressão gênica. Em um estudo comparativo entre câncer oral (tonsila) e câncer cervical mostrou que no câncer oral há uma maior positividade de p53, enquanto que no câncer cervical há uma maior expressão de pRb, p16 e p27, sugerindo que essa diferença pode ser justificada pelas taxas de mutações de p53 (LI et al., 2004).

Os danos produzidos no material genético devem ser sinalizados e corrigidos, e por isso são ativados mecanismos de controle da progressão pelo ciclo celular – os *checkpoints* – quando as condições internas são desfavoráveis à divisão celular (YOO et al., 2002). O controle da progressão do ciclo celular é promovido pelas Kinases dependente de ciclina

(CDK). O complexo ciclina/CDK é controlado por proteínas inibitórias (CKI) (BLOOM, PAGANO, 2003). A proteína p27 é uma CKI pertencente à família CIP/KIP que interage com o complexo ciclina/CDK, inibindo CDK4 e CDK2 interrompendo o ciclo celular. Embora exista oscilação de níveis de p27 durante as fases do ciclo, o nível máximo foi encontrado em células quiescentes e na fase G1. Em algumas anormalidades do ciclo celular a p27 exerce papel de supressora de tumor (BLOOM, PAGANO, 2003). No presente estudo nós verificamos o aumento da expressão de p27 em lesões orais. A presença de altos níveis de p27 é frequentemente encontrado em tecidos orais normais e benignos (PATAH et al., 2004). A elevada expressão de p27 tem sido relatada para induzir proteção celular através da morte programada (COQUERET, 2003). Nós verificamos elevada expressão quantitativa de p27 apresentando imunopositividade moderada à intensa. Em contraste, alguns estudos demonstraram a ausência da expressão de p27 em neoplasias malignas orais (KUO et al., 2002; SUPRIATNO et al., 2002). Geralmente, a alta expressão de p27 induz o ciclo celular para G1 e apoptose, inibindo a proliferação celular e levando a morte celular programada em carcinoma oral celular (SUPRIATNO et al., 2002). Por outro lado, a alta expressão de p27 pode estar associada ao estágio avançado da doença e com pior prognóstico de carcinoma esofágico (ANAYAMA et al., 1998; ITAMI et al., 1999). Portanto, é possível que o aumento da expressão de p27 pode estar associado à agressividade do câncer oral.

Por outro lado baixa expressão de p27 também foi observada em 6 de 19 carcinomas orais. Embora esta baixa expressão não é completamente entendida, a diminuição da função de p27 parece implicar em progressão maligna oral. (KIM et al., 2000) Em câncer oral, a p27 é considerada bom marcador, indicando suscetibilidade ao câncer oral, tempo de sobrevivência do paciente e potencial para metástase, principalmente quando a expressão é analisada com níveis de ciclina D1 (KUROPKAT et al., 2002). Deleções, metilações e aberrações proteolíticas devem ser a causa da baixa expressão de p27 (COQUERET, 2003). Recentes estudos demonstraram uma diminuição da expressão de p27 em vários tumores malignos (PATAH et al., 2004; KIM et al., 2000, HWANG et al., 2003). A degradação de p27 tem sido relatada com alto potencial metastático em câncer oral de células escamosas (KUDO et al., 2003). Poucos estudos avaliaram a relação entre a baixa expressão de p27 e tumor metastático de cabeça e pescoço em nódulos linfáticos.

Uma baixa expressão de p27 foi encontrada no carcinoma espinocelular oral associada à infecção por HPV 16 e 18 quando comparada à expressão em lesões infectadas por HPV6 e 11. Uma baixa expressão tem sido associada à infecção por HPV, onde as oncoproteínas virais parecem causar uma regulação negativa do gene p27, contribuindo para transformação

maligna celular (KIM et al., 2000). Em carcinomas cervicais, a baixa expressão de p27 tem sido relatada em infecção por HPV, e no carcinoma oral esta associação é controversa. A proteína E7 do HPV de alto risco parece relatar a inativação da p27 contribuindo para desregulação do gene (KIM et al., 2000).

No presente estudo nós verificamos uma elevada expressão de mdm2, principalmente em lesões pré-malignas, e baixa expressão nas demais lesões orais. Estudos recentes demonstraram superexpressão de mdm2 (51 e 64%) em cânceres cervical e oral (YANAMOTO, 2002). O mdm2 é um oncogene que apresenta alta expressão em uma variedade de tumores. Recentes estudos têm demonstrado que o mdm2 possui capacidade de se ligar diretamente a p53 e direcionar essa proteína para a degradação proteossômica, funcionando como uma ubiquitina ligase (HONDA et al., 1997). Através da ligação com mdm2, p53 é exportada para o citoplasma, p53 é degradada, e, posteriormente mdm2 retorna ao núcleo (FREADMAN, LEVINE, 1998). A função de p53 é dependente de estoques de mdm2 e, portanto a superexpressão desta proteína poderá acarretar a perda de controle de ciclo celular na G1/S, contribuindo para transformação maligna celular (YOO et al., 2002). A alta expressão imunohistoquímica está associada à proliferação maligna do tumor, indicando que é um bom marcador tumoral oral (PARTRIDGE, 1999). Interessantemente, em 3/18 (17%) leucoplasias com displasia moderada a severa e 4/19 (21%) de carcinoma oral de células escamosas apresentou uma expressão imunohistoquímica para mdm2 negativa. A ausência de expressão de mdm2 tem sido descrita como um marcador de prognóstico desfavorável em pacientes com câncer de pulmão e ovário submetido a tratamento quimioterápico (HIGASHIYAMA et al., 1997; TANNER et al., 1997). Em tumores malignos de cabeça e pescoço, a baixa expressão de mdm2 está associada ao avanço do estágio do tumor, relatando a progressão do tumor (MILLON et al., 2001). Curiosamente, uma diminuição da expressão foi observada nos carcinomas de mucosa oral, aparentemente não associado à presença do HPV. As oncoproteínas dos tipos de HPV de alto risco estão associadas à degradação de p53 esperando-se uma regulação positiva de mdm2 como ocorre com a proteína pRb (degrada) e p16INK4a que está superexpressa na presença de HPV no câncer oral (FREGONESI et al., 2003).

Neste estudo, nós verificamos alta expressão de catepsina B em leucoplasias e carcinomas orais de células escamosas, em comparação à lesões benignas (hiperplasia). Recentes estudos demonstraram que a catepsina B é um indicador confiável para diagnóstico e prognóstico associado à sobrevida de câncer oral metastático e invasivo (VIGNESWARAN et al., 2000). A catepsina B é um cisteíno protease lisossomal codificada pelo gene 8p22a e

está associada com *turnover* da matriz extracelular e na tumorigênese está associada a angiogênese, invasão e metástase (MIGNATTI; RIFKIN, 1996; RAO, 2003). A alta atividade da catepsina B é frequentemente observada em vários tumores, localizada na membrana plasmática das células tumorais para garantir a degradação da matriz extracelular e lâmina basal nos processos de invasão (TALIERI et al., 2004). A catepsina B parece possuir atividade de protease ativadora de morte celular independente de caspases, disparando sinal alternativo de apoptose em células tumorais (FU et al., 1998). Assim, é possível que o HPV possa interferir na sua ativação, impedindo a apoptose e garantindo a transformação maligna celular (KAZNELSON et al., 2004). Nossos estudos demonstraram a superexpressão de catepsina B em lesões orais e malignas infectadas por HPV 16 e 18, sugerindo que a modulação da expressão gênica de catepsina B possa ser desregulada sob a ação de oncoproteínas do HPV e com isso impedindo a apoptose em células infectadas pelos tipos de HPV de alto risco. A presença das oncoproteínas E6 e E7 parecem ser capazes de desregular a expressão de vários genes relacionados com o controle do ciclo-celular, como, 53, PCNA e p16/ink4a (SOARES et al, 2002; FREGONESI et al., 2003). Contudo, mais estudos devem ser realizados para investigar a influência do HPV em superexpressão de catepsina B.

No presente estudo, a avaliação da expressão de p27, mdm2 e catepsina B pelo índice de positividade, o qual desconta a expressão dessas proteínas em tecidos normais, permitiu uma boa discriminação entre lesões benignas, potencialmente malignas e malignas. A quantificação dessas proteínas sem levar em conta sua expressão basal demonstrou ser ineficiente na caracterização do comportamento biológico dos diferentes tipos histológicos de lesão oral. A utilização dessa estratégia de classificação vem sendo empregada em estudos conduzidos por nosso laboratório, permitindo melhor identificar o potencial biológico para a carcinogênese de mucosa oral (SOARES et al., 2005; TERESA et al., 2007).

A avaliação semiquantitativa e a contagem manual de células marcadas são procedimentos usualmente empregados na avaliação quantitativa de marcadores moleculares marcados por imunohistoquímica (CHIANG et al 2000; LIU; KLEIN-SZANTO, 2000; GARCIA-POLA et al, 2001; COLLETA et al, 2001; HAFIAN et al, 2004) e poucos estudos tem avaliado a quantificação de proteínas por análise de imagem (KUSHNER et al., 1997; TUMULURI et al., 2002). Entretanto, ao contrário dos observados nesses estudos (SOARES et al., 2006; TERESA et al., 2007), o presente trabalho demonstrou uma disparidade impressionante entre a análise de imagem e a avaliação quantitativa interobservador. A hipótese que nos parece responder a diferença de quantificação poderia ser a dificuldade potencial de delimitação entre o núcleo ou o citoplasma. Essa dificuldade de discriminação

na marcação nuclear e/ou citoplasmática foi relatada em estudos anteriores e considerada como principal fator limitante da avaliação quantitativa por análise de imagem (GUILLAUD et al., 1997; DE SOLORZANO et al., 2001). Abordagens metodológicas como a dupla marcação de membrana nuclear ou citoplasmática (DE SOLORZANO et al., 2001), bem como, a criação de logaritmos matemáticos nos programas de análise de imagem (GUILLAUD et al., 1997), poderia garantir uma melhor delimitação das regiões de interface nuclear ou citoplasmática. Dessa forma, ficaria facilitada a melhor caracterização da imunocoloração entre as inúmeras células que se justapõem na organização tecidual, evitando-se falsos positivos. Dessa forma, a quantificação por análise de imagem da expressão de proteínas por imunohistoquímica deveria ser avaliada com cautela, principalmente, quando essas proteínas possuem dispersão difusa pelo citoplasma ou pelo acúmulo de núcleos marcados nos tecidos.

Nós podemos concluir que os tipos de HPV de alto risco estão envolvidos em superexpressão de p27 e catepsina B, e que a interação viral e disfunção destas proteínas provavelmente contribuem nos processos de carcinogênese oral. Além disso, nossos resultados sugerem que a p27, mdm2 e a catepsina B poderiam ser considerados bons marcadores do desenvolvimento de câncer oral.

7. CONCLUSÕES

1. A presença do HPV foi encontrada em 38% das lesões de cavidade oral, com presença dos tipos de HPV de baixo risco (HPV6/11) em lesões benignas e tipos de alto risco (HPV 16/18) em lesões malignas. Não foram encontrados os tipos de HPV 31 e 33.
2. O aumento de expressão de p27 e catepsina B parece estar associado à infecção pelos tipos de HPV 6/11 e HPV16/18, sugerindo que o vírus possa desregular a expressão dessas proteínas contribuindo para a carcinogênese de mucosa oral. Nenhuma associação foi encontrada com a presença do HPV e a alteração na expressão de mdm2.
3. O aumento da expressão de p27 e catepsina B foi associado com as lesões epiteliais potencialmente malignas e malignas de mucosa oral, sugerindo que essas proteínas poderiam ser consideradas bons marcadores da carcinogênese oral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular biology of the cell. 4th. ed. New York: **Garland Science**, 2002. cap. 17, p. 1008.

ANAYAMA, T.; FURIHATA, M.; ISHIKAWA, T.; OHTSUKI, Y.; OGOSHI, S. Positive correlation between p27Kip1 expression and progression of human esophageal squamous cell carcinoma. **Int J Cancer.**, v. 79, n.4, p. 439-443, 1998.

ANTINORE, M. J.; BIRRER, M. J.; PATEL, D.; NADER, L.; MCCANCE, D. J. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the API family of transcription factors. **Embo J.**, v. 15, n.8, p. 1950-1960. 1996.

ANTUNES, J. L. F.; BIAZEVIC, M. G. H.; DE ARAÚJO, M. E.; TOMITA, N. E.; CHIANELLATO, L. E. M.; NARVAI, P. C. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil, 1980-1998. **Oral Oncol.**, v. 37, p. 345-350, 2001.

ARTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutat Res.**, v. 464, n.1, p. 65-76, 2000

AVVAKUMOV, N.; TORCHIA, J.; MYNRYK, J. S. Interaction of the HPV E7 proteins with the pCAF acetyltransferase. **Oncogene.**, vol. 22, p. 3833-3841, 2003.

AXÉLL, T.; PINDBORG, J. J.; SMITH, C. J.; VANDER WAAL, I. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21, **J Oral Pathol Med.**, v. 25, p. 49-54, 1996.

BERNAT, A.; AVVAKUMOV, N.; MYMRYK, J. S.; BANKS, L. Interaction between the HPV E7 oncoprotein and the transcriptional coactivator p300. **Oncogene.**, v. 22, p. 7871-7881, 2003.

BETTINI, J. S.; SOARES, E. G.; Duarte, G.; SIMOES, R. T.; SIMOES, A. L. PCR diagnosis of HPV in cervical biopsies of CIN and invasive neoplasia formerly diagnosed as HPV negative. **Acta Cytol.**, v. 47, n.4, p. 545-549, 2003.

BIRNER P.; BACHTIARY, B.; DREIER, B.; SCHINDL, M.; JOURA, E. A.; BREITENECKER, G.; OBERHUBER, G. Signal-amplified colorimetric in situ hybridization for assessment of human papillomavirus in cervical lesions. **Mod Pathol.** v.14, p.702-709, 2001.

BLOOM, J.; PAGANO, M. Deregulated degradation of the CDK inhibitors and malignant transformation. **Sem. Cancer Biol.**, v.13, p. 41-47, 2003.

BREHM, A.; NIELSEN, S. J.; MISKA, E. A.; MCCANCE, D. J.; REID, J. L.; BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. **Embo J.**, v. 18, n.9, p. 2449-2458, 1999.

BROUHA, X. D.; TROMP, D. M.; HORDIJK, G. J.; WINNUBST, J. A.; DE LEEUW, J. R. Oral and pharyngeal cancer: analysis of patient delay at different tumour stages. **Head Neck**, v.27, p.939-945, 2005.

BUNDGAARD, T.; BENTZEN, S.M.; WILDT, J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol Eur J Cancer**, v. 30B, p. 323-328, 1994.

CAMUS, S.; HIGGINS, M.; LANE, D. P.; LAIN, S. Differences in the ubiquitination of p53 by Mdm2 and the HPV protein E6. **Febs Lett.**, v. 536, p. 220-224, 2003.

CHAKRABART, O. E KRISHNA, S. Molecular interactions of 'high risk' human papillomaviruses E6 and E7 oncoproteins: implications for tumour progression. **J Biosci.**, v. 28, n.3, p. 337-348, 2003.

CHEN, R.; AALTONEN, L. M.; VAHERI, A. Human papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis. **Rev Med Virol.**, v. 15, n.6. p. 351-363, 2005.

CHEN, Y.; JIN, Y.; SHICH, D.; TSAI, S.; WU, L. Molecular characterization of angiogenic properties of human oral squamous cell carcinoma cells. **Oral Oncology.**, v. 38, p. 699-705, 2002.

CHETTY, R. Cyclin E and p27: their putative role as prognostic markers. **Cur Diagn Pathol.**, v. 8, p. 289-296, 2002.

CHIANG; C. P.; LANG, M. J.; LIU, B. Y.; WANG, J. T.; LEU, J. S.; HAHN, L. J.; KUO, M. Y. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oral submucous fibrosis, in oral epithelial hyperkeratosis and oral epithelial dysplasia in Taiwan. **Oral Oncol.**,v. 36: p.353-359, 2000.

CHOO, K. B.; CHEN, C. M.; HAN, C. P.; CHENG, W. T.; AU, L. C. Molecular analysis of cellular loci disrupted by papillomavirus 16 integration in cervical cancer: frequent viral integration in topologically destabilized and transcriptionally active chromosomal regions. **J Med Virol.**, v. 49, n.1, p. 15-22, 1996.

COGLIANO, V. J. Current criteria to establish human carcinogens. **Semin Cancer Biol**, v.14, n.6, Dec, p.407-12. 2004.

COLETTA, G.; CARDILLO, M. R.; LAZZERESCHI, D.; GANDINI, O.; DI SILVERIO, F. Transforming growth factor-beta pathway in human renal cell carcinoma and surrounding normal-appearing renal parenchyma. **Anal Quant Cytol Histol.**, v. 23, n.2, p. 109-117, 2001.

COLETTA, R. D.; GRANER, E.; LOPES, M. A.; VARGAS, P. A.; JORGE, J. Jr.; ALMEIDA, O. P. Os avanços da biologia molecular e o câncer bucal. **Rev. APCD**, v. 56, p. 62-66, 2002.

COOPER, G. M. **The Cell: a molecular approach**. 2nd. Ed. Washington, DC: ASM, 2000. cap. 14, p. 583.

COQUERET, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?. **Trends Cell Biol.**, v. 13, n.2, p. 65-70, 2003.

COQUERET, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment. **Trends Cell Biol.**, v.13, n.2, p. 65-70, 2000.

CORTEZZI, S. S.; PROVAZZI, P. J.; SOBRINHO, J. S.; MANN-PRADO, J. C.; REIS, P. M. P.; FREITAS, S. E. N.; FILHO, J. F. G.; FUHKUYAMA, E. E.; CORDEIRO, J. A.; CURY, P. M.; MANIGLIA, J. V.; VILLA, L. L.; TAJARA, E. H.; RAHAL, P. Analysis of Human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet.**, v. 150, p. 44-49, 2004.

CRUSIUS K, RODRIGUEZ, I.; ALONSO, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. **Virus Genes.**, v. 20, n.1, p. 65-69, 2000.

DAVY, C. E.; JACKSON, D. J.; WANG, Q.; RAJ, K.; MASTERSON, P. J.; FENNER, N. F.; SOUTHERN, S.; CUTHILL, S.; MILLAR, J. B.; DOORBAR, J. Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16. **J Virol.**, v. 76, n.9, p. 9806-9818, 2002.

D' COSTA, J.; SARANATH, D.; DEDHIA, P.; SANGHVI, V.; MEHTA, A.R. Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. **Oral Oncol**, v.34, p.413-420, 1998.

DE SOLORZANO C.O., MALLADI R., LELIEVRE S.A., LOCKETT S.J. Segmentation of nuclei and cells using membrane related protein markers. **J Microsc.**, v. 201, | pt3 | p. 404-415, 2001.

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol.**, v. 32supp/I, p. 7-15, 2005

DUENSING, S.; MUNGER, K. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. **Int J Cancer.**, v. 109, n.2, p. 157-162, 2004.

ENZENAUER, C.; MENGUS, G.; LAVIGNE, A.; DAVIDSON, I.; PFISTER, H.; MAY, M. Interaction of human papillomavirus 8 regulatory proteins E2, E6 and E7 with components of the TFIID complex. **Intervirology.**, v. 41, n.2-3, p. 80-90, 1998.

FERLAY, J.; PARKIN, D. M.; PISANI, P. **Globocan 2000: cancer incidence and mortality worldwide.** Lyon, France: IARC; 2001.

FORNATORA, M.; JONES, A. C.; KERPEL, S.; FREEDMAN, P. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (koilocytic dysplasia): an entity of unknown biologic potential. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod.**, v. 82, n.1, p. 47-56, 1996.

FRANCO, E. L.; KOWALSKI, L. P.; OLIVEIRA, B. V.; CURADO, M. P.; PEREIRA, R. N.; SILVA, M. E.; FAVA, A. S.; TORLONI, H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer.**, v. 43, n.6, p. 992-1000, 1989.

FREEDMAN, D. A.; LEVINE, A. J. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. **Mol Cell Biol.**, v.18, n.12, p. 7288-7293, 1998.

FREGONESI, P. A. G.; TERESA, D. B.; DUARTE, R. A.; NETO, C. B.; OLIVEIRA, M. R. B.; SOARES, C. P.. P16 Immunohistochemical over expression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. **J Histochem & Cytochem.**, v. 51, n.10, p. 1291-1297, 2003.

FU, Y. H.; NISHINAKA, T.; YOKOYAMA, K.; CHIU, R. A. Retinoblastoma susceptibility gene product, RB, targeting protease is regulated through the cell cycle. **FEBS Lett.**, v. 421, p. 89-93, 1998.

GARCIA-POLA, V. M. J.; ROLDAN, A. M. J.; ALVAREZ, F. B. E.; MARTIN, G. J. M.; LOPEZ-MUNIZ, A. Study comparative of Ki-67 expression in oral lichen planus and oral leukoplakia. Quantitative analysis. **Med Oral.** v.6: p.364-70, 2001.

GERVÁSIO, O. L.; DUTRA, R. A.; TARTAGLIA, S. M.; VASCONCELLOS, W. A.; BARBOSA, A. A.; AGUIAR, M. C. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. **Braz Dent J.**, v. 12, n.1, p. 57-61, 2001.

GIOVANNELLI, L.; CAMPISI, G.; LAMA, A.; GIAMBALVO, O.; OSBOM, J.; MARGIOTTA, V.; AMMATUNA, P. Human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. **J Infect Dis.**, v. 185, n.6, p. 833-836, 2002.

GONÇALVES, W. C.; CHI, A. C.; NEVILLE, B. W. Common Oral Lesions: Part II. Masses and Neoplasia. **Am Fam Physician.**, v. 75, n.4, p. 509-512, 2007.

GONZALEZ MOLES, M. A.; RODRIGUEZ-ARCHILLA, A.; RUIZ-AVILA, I.; GONZALEZ-MOLES, S.; MARFIL-ALVAREZ, R. Increase of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in HPV-18 positive oral squamous cell carcinomas. **Acta Stomatol Belg.**, v. 93, n.3, p. 113-118, 1996.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de Câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev Bras Cancerol.**, v. 51, n.3, p. 227-234, 2005.

GUILLAUD, M.; MATTHEWS, J. B.; HARRISON, A.; MACAULAY, C.; SKOV, K. A novel image cytometric method for quantification of immunohistochemical staining of cytoplasmic antigens. **Anal Cell Pathol.** v.14, n.2: p.87-99, 1997.

GUINEC, N.; DALET-FUMERON, V.; PAGANO, M. Quantitative study of the binding of cysteine proteinases to basement membranes. **FEBS Lett.**, v. 308, n.3, p. 305-308, 1992.

HAFIAN, H.; VENTEO, L.; SUKHANOVA, A.; NABIEV, I.; LEFEVRE, B.; PLUOT, M. Immunohistochemistry study of DNA topoisomerase II alpha, p53 and Ki-67 in oral preneoplastic lesions and oral squamous cell carcinomas. **Human Pathol.** v.35: p.745-751, 2004.

HEBNER, C. M. e LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol.**, v. 16, p. 83-97, 2006.

HEISE, A.; The clinical significance of HPV. **Nurse Pract.**, v. 28, n.10, p. 8-19; quiz 20-1, 2003.

HIGASHIYAMA, M.; DOI, O.; KODAMA, K.; YOKOUCHI, H.; KASUGAI, T.; ISHIGURO, S.; TAKAMI, K.; NAKAYAMA, T.; NISHISHO, I. MDM2 gene amplification and expression in non-small-cell lung cancer: immunohistochemical expression of its protein is a favourable prognostic marker in patients without p53 protein accumulation. **Br J Cancer.**, v. 75, n.9, p. 1302-1308, 1997.

HOFFMANN, M.; LOHREY, C.; HUNZIKER, A.; KAHN, T.; SCHWARZ, E. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 genotypes in head and neck carcinomas. **Oral Oncology**, v. 40, n.5, p. 520-524, 2004.

HONDA, R.; TANAKA, H.; YASUDA, H. Oncoprotein mdm2 is an ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. **FEBS Lett.**, v. 420, p. 25-27, 1997.

HOWLEY, P. Papillomavirinae: The viruses and their replication. In: B. N. Fields, D. M. Knipe, *et al* (Ed.). **Fields Virology**_LIPPINCOTT-RAVEN, 1994. Papillomavirinae: The viruses and their replication, p. 2045-2076

HSIEH, L. L.; CHIEN, H. T.; CHEN, I. H.; LIAO, C. T.; WANG, H. M.; JUNG, S. M.; WANG, P. F.; CHANG, J. T.; CHEN, M. C.; CHENG, A. J. The XRCC1 399Gln polymorphism and the frequency of p53 mutations in Taiwanese oral squamous cell carcinomas. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 12, n.5, p. 439-443, 2003.

HUANG, S. M.; MCCANCE, D. J. Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein p/300 and P/CAF. **J Virol.**, v. 76, p. 8710-8721, 2002.

HUDELIST, G.; MANAVI, M.; PISCHINGER, K. I.; WATKINS-RIEDEL, T.; SINGER, C. F.; KUBISTA, E.; CZERWENKA, K. F. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. **Gynecol Oncol.**, v.92, n.3, p. 873-80, 2004.

HWANG, C. F.; SU, C. Y.; HUANG, S. C.; HUANG, C. C.; FANG, F. M.; LUI, C. C.; CHANG, H. W.; CHO, C. L. Low expression levels of p27 correlate with loco-regional recurrence in nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Lett.**, v. 189, n.2, p. 231-6, 2003.

IBRAHIM, S. O.; LILLEHAUG, J. R.; JOHANNESSEN, A. C.; LIAVAAG, P. G.; NILSEN, R.; VASSTRAND, E. N. Expression of biomarkers (p53, transforming growth factor alpha, epidermal growth factor receptor, c-erb-2/neu and the proliferative cell nuclear antigen) in oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, v. 35, p. 302-313, 1999.

ITAMI, A.; SHIMADA, Y.; WATANABE, G.; IMAMURA, M. Prognostic value of p27(Kip1) and CyclinD1 expression in esophageal cancer. **Oncology**, v. 57, n.4. p. 311-317, 1999.

KABSCH, K.; MOSSADEGH, N.; KOHL, A.; KOMPOSCH, G.; SCHENKEL, J.; ALONSO, A.; TOMAKIDI, P. The HPV-16 E5 protein inhibits TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in human keratinocyte raft cultures. **Intervirology**, v. 47, n.1, p. 48-56, 2004.

KABSCH, K.; ALONSO, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. **J Virol.**, v. 76, n.23, p. 12162-12172, 2002.

KAZNELSON, D. W.; BRUNN, S.; MONRAD, A.; GJERLOV, S.; BIRK, J.; RÖPKE, C.; NORRILD, B. Simultaneous human papilloma virus type 16 E7 and CDK inhibitor p21 expression induces apoptosis and cathepsin B activation. **Virology.**, v. 320, p. 301-312, 2004.

KIM, Y. T.; CHOI, E. K.; CHO, N. H.; KO, J.H.; YANG, W. I.; KIM, J. W.; LEE, S. H. Expression of cyclin E and p27 in cervical carcinoma. **Cancer Lett.**, v. 153, p. 41-50, 2000.

KLIMOV, E.; VINOKOUROVA, S.; MOISJAK, E.; RAKHMANALIEV, E.; KOBSEVA, V.; LAIMINS, L.; KISSELJOV, F.; SULIMOVA, G. Human papilloma viruses and cervical tumours: mapping of integration sites and analysis of adjacent cellular sequences. **BMC Cancer.**, v. 2, p. 24, 2002.

KORABIOWSKA, M.; TSCHERNY, M.; GROHMANN, U.; HONIG, J. F.; BARTKOWSKI, S. B.; CORDON-CARDO, C.; BRINCK, U. Decreased expression of Ku70/Ku80 proteins in malignant melanomas of the oral cavity. **Anticancer Res.**, v. 22, n.1A, p. 193-196, 2002.

KOVESI, G. E SZENDE, B. Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. **Oncology.**, v. 65, n.4, p. 331-336, 2003.

KOWALSKI, L. P.; CARVALHO, A. L. Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. **Oral Oncol.**, v. 3, p. 794-98, 2001.

KUDO, Y.; KITAJIMA, S.; SATO, S.; MIYAUCHI, M.; OGAWA, I.; TAKATA, T. Establishment of an oral squamous cell carcinoma cell line with high invasive and p27 degradation activities from a lymph node metastasis. **Oral Oncol.**, v. 39, n.5, p. 515-520, 2003.

KUFFER, R.; LOMBARDI, T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN) - Review. **Oral Oncol.**, v. 38, p.125-130, 2002.

KUO, M. Y.; HSU, H. Y.; KOK, S. H.; KUO, R. C.; YANG, H.; HAHN, L. J.; CHIANG, C. P. Prognostic role of p27(Kip1) expression in oral squamous cell carcinoma in Taiwan. **Oral Oncol.**, v. 38, n.2. p. 172-178, 2002.

KUROPKAT, C.; VENKATESAN, T. K.; CALDARELLI, D.D.; PANJE, W. R.; HUTCHINSON, J.; PREISLER, H. D.; COON, J. S.; WERNER, J.A.- Abnormalities of molecular regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. **Auris Nasus Larynx.**, v. 29, p. 165-174, 2002.

KUSHNER, J.; BRADLEY, G.; JORDAN, R. C. Patterns of p53 and Ki-67 protein expression in the epithelial dysplasia from the floor of mouth. **J Pathol.** v.183: p.418-423, 1997.

LEITE, I. C.; KOIFMAN, S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Oral Oncol.**, v. 34, n.5, p. 347-352, 1998.

LEVAV-COHEN, Y.; GOLDBERG, Z.; ZUCKERMAN, V.; GROSSMAN, T.; HAUPT, S.; HAUPT, Y. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 331, p. 737-749, 2005.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell.**, v. 88, p. 323-331, 1997.

LI, M.; BROOKS, C. L.; WU-BAER, F.; CHEN, D.; BAER, R.; GU, W. Mono-versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by mdm2. **Science.**, v. 302, p. 1972-1975, 2003.

LI, W.; THOMPSON, C. H.; COSSART, Y. E.; O'BRIEN, C. J.; LIU, J.; SCOLYER, R.; CARTER, J. R.; DALRYMPLE, C.; ROSE, B. R. The site of infection and ethnicity of the patient influence the biological pathways to HPV-induced mucosal cancer. **Mod Pathol.**, v. 17, p. 1031-1037, 2004.

LI, X.; COFFINO, P. G. High risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. **J Virol.**, v. 70, p. 4509-4516, 1996.

LIU, S.C., KLEIN-SZANTO A.J.P. Markers of proliferation in normal and leucoplakic oral epithelia. **Oral Oncol.**, v. 36: p.145-151, 2000.

LIU, S. C.; KLEIN-SZANTO, A. J. P. Markers of proliferation in normal and leucoplakic oral epithelia. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 145-151, 2000.

LO MUZIO, L.; NOCINI, P.; MIGNOGNA, M. D.; PANNONE, G.; STAIBANO, S.; PROCACCINI, M.; RUBINI, C.; FIORONI, M.; FANALI, S.; PIATTELLI, A. Immunocytochemical detection of hMSH2 and hMLH1 expression in oral melanoma. **Anticancer.**, v. 20, n.2A, p. 741-748, 2000.

LOPES OCEJO, O.; VILORIA-PETIT, A.; BEQUET-ROMERO, M.; MUKHOPAHYAY, D.; RAK, J.; KERBEL, R. S. Oncogenes and tumor angiogenesis: the HPV-16 E6 oncoprotein activates the vascular

endothelial growth factor (VEGF) gene promoter in a p53 independent manner. **Oncogene.**, v. 19, n.40, p. 4611-4620, 2000.

MAJEWSKI, S.; JABLONSKA, S. Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. **Journ Am Acad Derm.**, v. 36, p.659-685. 1997.

MALDONADO, E.; CABREJOS, M. E.; BANKS, L.; ALLENDE, J. E. Human papillomavirus-16 E7 protein inhibits the DNA interaction of the TATA binding transcription factor. **J Cell Biochem.**, v. 85, n.4, p. 663-669, 2002.

MANOS, M. M.; Y. TING, D. K.; WRIGHT, A. J.; LEWIS, T. R.; BROKER, AND S. M. WOLINSKY. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. In In: FURTH, M.; GREAVES, M. (Ed.). **Molecular diagnostics of human cancer: Cancer cells**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. v. 7, p. 209-214.

MANTOVANI, F.; BANKS, L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. **Oncogene.**, v. 20, n.54, p. 7874–7887, 2001.

MCGLENNEN, R. C. Human papillomavirus oncogenesis. **Clin Lab Med.**, v. 20, n.2, p. 383-406, 2000.

MCMURRAY, H. R.; MCCANCE, D. J. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. **J virol.**, v. 77, n.18, p. 9852-9861, 2003.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F.; MCANCE, D. J. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol.**, v. 82, n.1, p. 15-33, 2001.

MENDELSON, J.; HOWLEY, P. M.; ISRAEL, M. A.; LIOTTA, L. A. The molecular basis of cancer. cidade: Editora, 2001. v. 2.

MIGNATTI, P. E.; RIFKIN, D. B. Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. **Enzyme Protein.**, v. 49, p. 117-137, 1996.

MIGUEL, R. E.; VILLA, L. L.; CORDEIRO, A. C.; PRADO, J. C.; SOBRINHO, J. S.; KOWALSKI, L. P. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. **Am J Surg.**, v. 176, p. 428-429, 1998.

MIHALAS, G. I.; NEAMTU, M.; OPRIS, D.; HORHAT, R. F. **Chaos Solitons and Fractals.**, v. 30, p. 936-945, 2006.

MILLER, C. S.; WHITE, D. K. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 82, n.1, p. 57-68, 1996.

MILLER, C. S.; JOHNSTONE, B. M.; KY, L. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis, 1982-1997. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol Endod.**, v. 91, n.6, p. 622-635, 2001.

MILLON, R.; MILLER, D.; SCHULTZ, I.; SALVI, R.; GHNASSIA, J. P.; FREBOURG, T.; WASYLYK, B.; ABECASSIS, J. Low of mdm2 expression in head and neck squamous cell carcinoma and clinical significance. **Oral Oncol.**, v. 37, p. 620-631, 2001.

MOIN, K.; CAO, L. DAY, N. A.; KOBLSKI, J. E.; SLOANE, B. F. Tumor cell membrane cathepsin B. **Biol Chem.**, v. 379, 1093-1099, 1998.

MONSONEGO, J.; BOSCH, F. X.; COURSGET, P.; COX, J. T.; FRANCO, E.; FRAZER, I.; Sankaranarayanan, R.; Schiller, J.; Singer, A.; Wright, T.C. Jr.; Kinney, W.; Meijer, C. J.; Linder, J.; McGoogan, E.; Meijer, C. Cervical cancer control, priorities and new directions. **Int J Cancer.**, v. 108, p. 329-333, 2004.

MOTOYAMA, S.; LADINES-LLAVE, C. A.; VILLANUEVA, S. L.; MARVO, T. The Role of Human Papillomavirus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis. **J Med Sci.**, v. 50, p. 9-19, 2004.

NAGLER, D. K.; STORER, A. C.; PORTARO, F. C. V.; CARMONA, E.; JULIANO, L E MÉNARD, R. Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. **Biochemistry.**, v. 36, p. 12608-12615, 1997.

NAGPAL, J. K.; DAS, B. R. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. **Oral Oncol.**, v. 39, n.3, p. 213-221, 2003.

NAKAMURA, S.; GOMYO, Y.; ROTH, J. A.; MUKHOPADHYAY, T. C-terminus of p53 is required for G(2) arrest. **Oncogene.**, v. 21, n.13, p. 2102-2107, 2002.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin.**, v. 52, n.4, p. 195-215, 2002.

NGUYEN, D. X.; WESTBROOK, T. F.; MCCANCE, D. J. Human papillomavirus type 16 E7 maintains elevated levels of the cdc25A tyrosine phosphatase during deregulation of cell cycle arrest. **J Virol.**, v. 76, n.2, p. 619-632, 2002.

OGMUNDSDOTTIR, H. M.; HILMARSDDOTTIR, H.; ASTVALDSDOTTIR, A.; JOHANNSSON, J. H.; HOLBROOK, W. P. Oral lichen planus has a high rate of TP53 mutations. **Eur J Oral Sci.**, v. 110, n.3, p. 192-198, 2002.

OLIVIER, M.; EELES, R.; HOLLSTEIN, M.; KHAN, M. A.; HARRIS, C. C.; HAINAUT, P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Human Mutat.**, v. 19, p. 607-614, 2002.

ONOFRE, M. A.; SPOSTO, M. R.; NAVARRO, C. M. Reliability of toluidine blue application in the detection of oral epithelial dysplasia and in situ and invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, vol. 91, p. 535-540, 2001.

OSTWALD, C.; RUTSATZ, K.; SCHWEDER, J.; SCHMIDT, W.; GUNDLACH, K.; BARTEN, M. Related Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. **Med Microbiol Immunol (Berl)**. v. 192, n.3, p. 145-148, 2003.

PANDE, P.; MATHUR, M.; SHUKLA, N. K.; RALHAN, R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. **Oral oncol.**, v. 34, n.5, p. 396-403, 1998.

PAPAROTTO LOPES, S. M.; MEEKS, V. I. Analysis of HPV 16 and 18 by in situ hybridization in oral papilloma of HIV+ patients. **Gen Dent**. v. 49: p.386-389, 2001.

PARTRIDGE, M.; KIGUWA, S.; EMILION, G.; PATEROMICHELAKIS, S.; A'HERN, R.; LANGDON, J. D. New insights into p53 protein stabilisation in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 35, n.1, p. 45-55, 1999.

PATAH, L. E. M.; CAMAROTO, K. C.; GONÇALVES, W. J. P27 expression in epithelial ovarian tumors. **Int J Gynecol Obstet.**, v. 85, n.2, p. 179-180, 2004.

PENHALLOW, J.; STEINGRIMSDOTTIR, H.; ELAMIN, F.; WARNAKULASURIYA, S.; FARZANEH, F.; JOHNSON, N.; TAVASSOLI, M. p53 alterations and HPV infections are common in oral SCC: p53 gene mutations correlate with the absence of HPV 16-E6 DNA. **Int J Oncol.**, v. 12, n.1, p. 59-68, 1998.

PODGORSKI, I.; SLOANE, B. F. Cathepsin B and its role(s) in cancer progression. **Biochem Soc Symp.**, v. 70, p. 263-276, 2003.

QIN, G. Z.; PARK, J. Y.; CHEN, S. Y.; LAZARUS, P. A high prevalence of p53 mutations in pre-malignant oral erythroplakia. **Int J Cancer.**, v. 80, n.3, p. 345-348, 1999.

RAGIN, C. C.; MODUGNO, F.; GOLLIN, S. M. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus. **J Dent Res.**, v. 86, n.2, p. 104-114, 2007.

RAO, J. S. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. **Nat Rev Cancer.**, v. 3, n.7, p. 489-501, 2003.

REGEZI, J. A.; SCIUBA, J. J. **Patologia Bucal: correlações clinicopatológicas**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.64-84.

REIBEL, J. Tobacco and oral diseases. Update on the evidence, with recommendations. **Med Princ Pract**, v.12 Suppl 1, p.22-32, 2003.

RITCHIE, J. M.; SMITH, E. M.; SUMMERSGILL, K. F.; HOFFMAN, H.T.; WANG, D.; KLUSMANN, J. P.; TUREK, L. P.; HAUGEN, T. H. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. **Int J Cancer.**, v. 104, n.3, p. 336-344, 2003.

SAND, L.; JALOULI, J.; LARSSON, P. A. E HIRSCH, J. M. Human papillomaviruses in oral lesions. **Anticancer Res.**, v. 20, n. 2B, p. 1183-1188, 2000.

SANGUINETTI, C. J.; E. DIAS NETO, AND A.J. SIMPSON. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques.**, v. 17, p. 914-921, 1994.

SARANATH, D.; TANDLE, A. T.; TENI, T. R.; DEDHIA, P. M.; BORGES, A. M.; PARIKH, D.; SANGHAVI, V.; MEHTA, A. R. p53 inactivation in chewing tobacco-induced oral cancers and leukoplakias from India. **Oral Oncol.**, v. 35, p. 242-250, 1999.

SATO, Y.; SUGIE, R.; TSUCHIYA, B.; KAMEYA, T.; NATORI, M.; MUKAI, K. Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. **Diagn Mol Pathol.**, v. 10, n.4, p. 265-271, 2001.

SCHEFFNER, M.; WHITAKER, N. J. Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. **Semin Cancer Biol.**, v.13, n.1, p.59-67, 2003.

SCULLY, C. E PORTER, S. ABC of oral health. Oral cancer. **Oral Cancer.**, v. 321, n.7253, p. 97-100, 2000.

SCULLY, C.; FIELD, J.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN):1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 256-263, 2000.

SKRZYDLEWSKA, E.; SULKOWSKA, M.; KODA, M.; SULKOWSKI, S. Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. **World J Gastroenterol.**, v. 11, n.9, p. 1251-1266, 2005.

SMITH, E. M.; WANG, D.; KIM, Y.; RUBENSTEIN, L. M.; LEE, J. H.; HAUGEN, T. H.; TUREK, L. P. p16^{ink4a} Expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. **Oral Oncology.**, 2007.

SMITH, E. M.; RITCHIE, J. M.; YANKOWITZ, J.; SWARNNAVEL, S.; WANG, D.; HAUGEN, T. H.; TUREK, L. P. Human papillomavirus prevalence and types in newborns and parents: concordance and modes of transmission. **Sex Transm Dis.**, v. 31, n.1, p. 57-62, 2004.

SOARES, C.P.; DE CASTRO, J. L.; PINHEIRO, A. L.; WERNECK, C. E. The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. **Photomed Laser Surg.**, v. 23, n.6, p. 586-589, 2005.

SOARES, C. P.; ZUANON, J. A. S.; TERESA, D. B.; FREGONEZI, P. A. G.; NETO, C. B.; OLIVEIRA, M. R. B.; DONADI, E. A.; KLÄY, C. M.; SOARES, E. G. Quantitative cell-cycle proteins expression in oral cancer assessed by computer-assisted system. **Histol Histopatol.** v.21, p.721-728, 2006.

SOARES, C. P.; NETO, C.B.; FREGONEZI, P. A. G; TERESA, D. B. et al. Computer-assisted analysis of p53 and PCNA expression on oral lesions infected with human papillomavirus. **Anal Quant Cytol Histol.**, v. 25, n.1, p. 19-24, 2003a.

SOARES, C. P.; MALAVAZI, I.; DOS REIS, R. I.; NEVES, K. A; NETO, C. B.; SPOLIDÓRIO, L. C.; DE OLIVEIRA M. R. Presença do papilomavírus humano em lesões malignas de mucosa oral. **Rev Bras Soc Med Trop.**, v. 35, p. 439-444, 2000b.

SOARES, C. P.; DOS REIS, R. I.; KIMURA, S. S.; TERESA, D. B.; NETO, C. B.; LONGATTO-FILHO, A.; MAEDA, M. Y. S.; SANTOS, R. T. M. Papilomavírus humano (HPV) em lesões benignas e malignas de mucosa oral pelos métodos de hibridização in situ e imunohistoquímica. **Rev Cienc Farm.**, v. 23, p. 123-132, 2002c.

SOUZA, P. E. A.; MESQUITA, R. A.; GOMES, R. S. Evaluation of p53, PCNA, Ki-67, mdm2 and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. **Oral Disease.**, v. 6, p. 35-39, 2000.

ST JOHN, M. A.; ABEMAYOR, E.; WONG, D. T. Recent new approaches to the treatment of head and neck cancer. **Anticancer Drugs.**, v. 17/n.4, p. 365-375, 2006.

STUBENRAUCH, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. **Semin Cancer Biol.**, v. 9, n.6, p. 379-386, 1999.

STURGIS, E. M.; CASTILHO, E. J.; LI, L.; ZHENG, R.; EICHER, S. A.; CLAYMAN, G. L.; STROM, S. S.; SPITZ, M. R.; WEI, Q. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Carcinogenesis**, v. 20, n.11, p. 2125-2129, 2000.

SUGIYAMA, M.; BHAWAL, U. K.; DOHMEN, T.; ONO, S.; MIYAUCHI, M.; ISHIKAWA, T. Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. **Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 95, n.5, p. 594-600, 2003.

SUPRIATNO; HARADA, K.; YOSHIDA, H.; SATO, M. Low p27Kip1 expression is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res.** v. 22, n.5, p. 2985-2989, 2002.

SYRJANEN, F. C.; TERVAHAUTA, A.; SYRJANEN, K. Tumorigenesis associated with p53 tumor suppressor gene. **Br J Cancer**., v. 68, p. 653-661, 1993.

SYRJÄNEN, K; SYRJÄNEN, S. **Papillomavirus infections in human disease**. New York: Wiley; 2000. p. 615,

SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. **J Clin Virol.**, v. 32S, p. S59-S66, 2005.

TALIERI, M.; PAPADOPOULOU, S.; SCORILAS, A.; XYNOPOULOS, D.; ARNOGIANAKI, N.; PLATANIOTIS, G.; YOTIS, J.; AGNANTI, N. Cathepsin B and cathepsin D expression in the progression of colorectal adenoma to carcinoma. **Cancer Lett.**, v. 205, p. 97-106, 2004.

TANNER, B.; HENGSTLER, J. G.; LAUBSCHER, S.; MEINERT, R.; OESCH, F.; WEIKEL, W.; KNAPSTEIN, P. G.; BECKER, R. mdm 2 mRNA expression is associated with survival in ovarian cancer. **Int J Cancer**., v. 74, n.4, p. 438-442, 1997.

TERESA, D. B.; NEVES, K. A.; NETO, C. B.; FREGONEZI, P. A. G.; OLIVEIRA, M. R. B.; ZUANON, J. A. S.; DONADI, E. A.; MENDES-JUNIOR, C. T.; SOARES, C. P. Computer-assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions. **Acta Histochem**, 2007.

THORLAND, E. C.; MYERS, S. L.; GOSTOUT, B. S.; SMITH, D. I. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. **Oncogene**., v. 22, n.8, p. 1225-1237, 2003.

TOMMASINO, M.; ACCARDI, R.; CALDEIRA, S.; DONG, W.; MALANCHI; SMET, A.; ZEHBE, I. The role of TP53 in Cervical carcinogenesis. **Hum Mutat.**, v. 21, n.3, p. 307-312, 2003.

TRAN, N.; ROSE, B. R.; O'BRIEN, C. J. Role of Human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer. **Head and Neck.**, v. 29, n.1, p. 64-70, 2007.

TSAI, T. C.; CHEN, S. L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. **Arch Virol.**, v. 148, n.8, p. 1445-1453, 2003.

TSAO, Y. P.; LI, L. Y.; TSAI, T. C.; CHEN, S. L. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. **J Virol.**, v. 70, n.11, p. 7535-7539, 1996.

TUMULURI, V.; THOMAS, G. A.; FRASER, I. S. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumor front of human oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.**, v.32: p.598-604, 2002.

UEDA, Y.; ENOMOTO, T.; MIYATAKE, T.; OZAKI, K.; YOSHIKAWA, T.; KANAO, Y.; UENO, Y.; NAKASHIMA, R.; SHROYER, K. R.; MURATA, Y. Monoclonal expansion with integration of high-risk type human papillomaviruses is an initial step for cervical carcinogenesis: association of clonal status and human papillomavirus infection with clinical outcome in cervical intraepithelial neoplasia. **Lab Invest.** v. 83, n.10, p. 1517-1527, 2003.

VAN DER WAAL, J.; SCHEPMAN, K. P. E VAN DER MEY, E. H. A modified classification and staging system for oral leukoplakia. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 264-266, 2000.

VAN DER WAAL, I.; AXÉLL, T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. **Oral Oncol.**, v. 38, p. 521-526, 2002.

VAN DER WAAL, I.; SCHEPMAN, K.P.; VAN DER MEY, E.H.; SMEELE, L.E. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. **Oral Oncol.**, v. 33, p. 291-301, 1997.

VELDMAN, T.; LIU, X.; YUAN, H.; SCHLEGEL, R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 100, n.14, p. 8211-8216, 2003.

VIGNESWARAN, N.; ZHAO, W.; DASSANAYAKE, A.; MULLER, S.; MILLER, D. M.; ZACARIAS, W. Variable expression of cathepsin B and D correlates with highly invasive and metastatic phenotype of oral cancer. **Hum Pathol.**, v. 31, p. 931-937, 2000.

VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. **Adv Cancer Res.**, v. 71, p. 321-341, 1997.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X.; KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; PETO, J.; MEIJER, C. J.; MUNOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer worldwide. **J Pathol.**, v. 189, p. 12-19, 1999.

WEINBERG, M. A.; ESTEFAN, D. J. Assessing oral malignancies. **Am Fam Physician.**, v. 65, p. 1379-1384, 2002.

WILSON, V. G.; WEST, M.; WOYTEK, K.; RANGASAMY, D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. **Virus Genes.** v. 24, n.3, p. 275-290, 2002.

WÜNSCH-FILHO V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncol.**, v. 38, n.8, p. 737-746, 2002.

XAVIER, S. D.; BUSSOLOTI FILHO, I.; LANCELOTTI, C. L. Prevalence of histological findings of human papillomavirus (HPV) in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma biopsies: preliminary study. **Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)**, v.71, n.4, Jul-Aug, p.510-514. 2005.

YANAMOTO, S.; KAWASAKI, G.; YOSHITOMI, I.; MIZUNO, A. P53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 94, n.5, p. 593-600, 2002.

YAN, S.; SLOANE, B. F. Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. **Biol Chem.**, vol. 384, n.6, p. 845-854, 2003.

YOO, J.; PARK, S. Y.; KANG, S. J.; SHIM, S. I.; KIM, B. K. Altered expression of G1 regulatory proteins in human soft tissue sarcomas. **Arch Pathol Lab Med.**, v. 126, p. 567-573, 2002.

ZHOU, B. B.; ELLEDGE, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature.**, v. 408, n.6811, p. 433-439, 2000.

ZIMMERMANN, H.; DEGENKOLBE, R.; BERNARD, H. U.; O'CONNOR, M. J. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. **J Virol.**, v. 73, n.8, p. 6209-6219, 1999.

ZIMMERMANN, H.; KOH, C.H.; DEGENKOLBE, R.; O'CONNOR, M. J.; MULLER, A.; STEGER, G.; CHEN, J. J.; LIU, Y.; ANDROPHY, E.; BERNARD, H.U. Interaction with CBP/p300 enables the bovine papillomavirus type 1 E6 oncoprotein to downregulate CBP/p300-mediated transactivation by p53. **J Gen Virol.**, v.81 | Pt11 | , p. 2617-2623, 2000.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer.**, v. 2, n.5, p. 342-350, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst.**, v. 92, p. 690-699, 2000.

ZUR HAUSEN, H. Roots and perspectives of contemporary papillomavirus research. **J Cancer Res Clin Oncol.**, v. 122, p. 3-13, 1996.