

O PAPEL DA PROTEINA p53 E DO GENE *TP53* NA
CARCINOGENESE BUCAL QUIMICAMENTE
INDUZIDA PELA 4NQO EM RATOS

ELIANA MARIA MINICUCCI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bases Gerais da Cirurgia, área agressão, reparação, regeneração e transplante de tecido, Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, para a obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Jair Cortez Montovani

Co-Orientadores: Profa. Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori

Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

Botucatu-SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Minicucci, Eliana Maria.

O papel da proteína p53 e do gene TP53 na carcinogênese bucal quimicamente induzida pela 4NQO em ratos / Eliana Maria Minicucci.
– Botucatu : [s.d.], 2008.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientador: Prof. Dr. Jair Cortez Montovani

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Daisy Maria Fávero Salvadori

Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro

Assunto CAPES: 40102009

1. Biologia molecular. 2. Carcinogênese. 3. Rato como animal de laboratório.

CDD 574.87

Palavras-chave: Carcinogênese bucal; Gene TP53 exons 5 a 8; Imunohistoquímica; Proteína p53; Rato Wistar; Sequenciamento genético; 4NQO.

DEUS, que se faz presente em nossas vidas, a cada momento e a cada passo, iluminando nossas mentes, compreendendo os nossos anseios e nos dando a necessária coragem para atingirmos nossos objetivos;

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira como respondemos aos desafios”

Henfil

“Feliz é o homem que sabe que não sabe e vai à busca do saber.”

DEDICATÓRIA

À minha mãe ÉDERA, dedico mais esta etapa vencida, com a mais profunda admiração e respeito. A ela que em muitos momentos precisou da minha atenção e que não pude estar presente, mas que sempre soube compreender; ao meu irmão DOMINGOS (DÚ), por todo o incentivo e apoio, e ao meu sobrinho LUCIANO, pelas vezes que lhe faltei com a atenção e carinho.

Aos Mestres

“A grandeza de um mestre só é descoberta quando o tempo nos mostrar o quanto ele será inesquecível. Ser um mestre inesquecível é formar seres humanos que farão diferença no mundo. Não é apenas retirar de si o conhecimento que enriquecerá o outro, mas mostrar, através do seu exemplo pessoal, a capacidade de superar o medo, a incerteza e enfrentar o que parece impossível, transformar cada lágrima numa lição de vida. Ensinar a transformar a informação em conhecimento e o conhecimento em experiência...”

ORIENTADOR

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jair Cortez Montovani, agradeço pela orientação neste trabalho e pela confiança em mim depositada.

AOS CO-ORIENTADORES:

Prof. Dr^a. Daisy Maria Fávero Salvadori, eximia pesquisadora e grande amiga, que me ensinou durante o mestrado, a base de uma pesquisa feita dentro dos princípios da ética e idoneidade científica, conhecimentos estes, que foram fundamentais para que eu enfrentasse todos os desafios e dificuldades deste doutorado.

Prof. Dr. Daniel Araki Ribeiro, um grande pesquisador e amigo, o qual esteve presente em todos os momentos deste desafio, sempre colaborando com paciência, dedicação, profissionalismo, e principalmente pela credibilidade na minha capacidade profissional.

AGRADECIMENTOS

Às colaboradoras *Profa. Dra. Maria Inês Pardini, Profa. Dra. Adriana Camargo Ferrasi, Juliana Guimarães*, em especial *Glenda Nicioli Silva (Glendinha)* a quem eu tenho muita admiração, respeito e amizade, a qual esteve presente em todas as etapas deste trabalho, sempre se dedicando, sem medir esforços, para que conseguíssemos finalizá-lo;

Elaine, Mariana, Vitor, Priscila e em especial ao *João Paulo*, que foi meu companheiro de finais de semanas e feriados (laboratório da Dra Daisy), e as meninas do hemocentro *Patrícia, Chiara*, em especial a *Ju Tocha*, grandes amigos que ganhei neste doutorado pelo companheirismo e amizade;

Às grandes amigas *Yara, Fernanda (SP), Silke, Eloísa, Renata* que sempre estiverem presentes, dando incentivos e dispostas a colaborar no que fosse preciso;

Ao Departamento de Dermatologia e Radioterapia a todos os docentes e funcionários;

À Profa. Dra. *Silvana Artioli Schellini*;

Aos funcionários do TOXICAM *Mara e Paulo* pela atenção e solicitude constante;

À Seção de Pós Graduação especialmente a *Regina e a Janete* por toda a orientação, paciência e dedicação;

Às bibliotecárias *Meire e Selma*;

Às secretárias *Nilce e Cinthia* do Departamento de OFT e ORL;

À *Andréia Sanches* do Instituto Ludwig – SP;

Às secretárias e amigas da Evidente *Patrícia e Dulciéia*;

À minha secretária *Naiara*;

Aos animais de experimentação, que abdicam suas vidas para o avanço da ciência;

À FAPESP pelo auxílio pecuniário.

“Dos amigos, nunca nos despedimos, apenas nos afastamos para darmos ao destino o prazer de nos reencontrarmos.”

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1 Considerações Gerais	3
1.2 Carcinogênese	4
1.2.1 Carcinogênese bucal	5
1.3 Lesões pré neoplásicas em mucosa oral	6
1.4 Gene Supressor Tumoral <i>TP53</i>	8
1.5 Proteína p53	10
2. OBJETIVO	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Delineamento experimental	16
3.2. Análise imunohistoquímica	16
3.3 Extração de DNA	17
3.4 Amplificação do gene <i>TP53</i> murino por PCR	18
3.5 Seqüenciamento de DNA	18
3.5.1 Purificação	18
3.5.2 Reação de marcação de fluorescente	19
3.5.3 Precipitação em placa	19
3.6 Análise das seqüências	19
3.7 Análise estatística	20
3.8 Questões éticas	20
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
8. ANEXOS	49

RESUMO

O teste de carcinogênese experimental em língua de rato Wistar que utiliza a 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) como agente cancerígeno, é um excelente modelo para se estudar o carcinoma espinocelular em todas as suas fases, além das lesões pré-neoplásicas e neoplásicas induzidas serem semelhantes às aquelas da cavidade bucal de seres humanos. O objetivo do presente estudo foi investigar o papel da proteína p53 e de mutações no gene supressor tumoral *TP53* exons 5 a 8 durante a carcinogênese induzida pela 4NQO em língua de rato Wistar. Para isso, 30 animais foram tratados com o cancerígeno na concentração de 50 ppm, por via oral (água de beber), e sacrificados 4, 12 ou 20 semanas após o tratamento. Dez animais foram utilizados como controle negativo. Os resultados mostraram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) com o aumento na expressão da proteína p53 nos grupos de animais sacrificados 12 e 20 semanas após a exposição ao cancerígeno, que também apresentaram lesões pré-neoplásicas e carcinomas espinocelulares, respectivamente. Fraca expressão da proteína p53 foi encontrada nos grupos controle e de 4 semanas de exposição ao carcinógeno. O sequenciamento genético dos exons 5 a 8 do gene *TP53* não indicou a presença de mutações. Concluindo, a expressão anômala da proteína p53 nas fases intermediária e final da carcinogênese bucal não pode ser relacionada à presença de mutações nos exons 5 a 8 do respectivo gene.

ABSTRACT

The medium-term tongue carcinogenesis assay is a useful model for studying oral squamous cell carcinomas phase by phase. The aim of the present study was to investigate the expressivity of p53, as well as mutations in exons 5-8 of TP53 gene during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) using immunohistochemistry and DNA sequencing, respectively. A total of 30 male Wistar rats were treated with 4-nitroquinoline 1-oxide in drinking water for 4, 12, and 20 weeks. Ten animals were used as negative control. Statistically differences ($p < 0.05$) were found in p53 expression 12 and 20 weeks after treatment, i.e., pre-neoplastic lesions and squamous cell carcinomas, respectively. A weak immunoexpression was observed in the negative control and in 'normal' oral mucosa following 4 weeks after exposure to 4NQO. Regarding DNA sequencing, no mutation was found in all of the exons evaluated at all experimental periods. Taken together, our results suggest that abnormal p53 expression was present in pre-neoplastic lesions and squamous cell carcinomas of the oral cavity. However, no mutations were detected during oral cancer progression.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

O câncer de cabeça e pescoço representa 10% dos casos diagnosticados de neoplasia maligna, sendo 40% na cavidade oral (Jacobs et al., 1987). O câncer de boca inclui os cânceres de lábio e cavidade oral (mucosa bucal, gengivas, palato duro, língua oral e assoalho bucal), sendo o oitavo mais comum de acordo com a Organização Mundial de Saúde. Para 2008, no Brasil, a estimativa de tumores de cavidade oral é de 10.380 casos entre homens e 3780 entre mulheres, sendo São Paulo o Estado foi apresenta maior estimativa, com 4510 novos casos, seguido pelo Rio de Janeiro com 2030 e Paraná com 1020 (INCA, 2007).

Mundialmente, mais de 300.000 novos casos de carcinoma espinocelular (CEC) são diagnosticados anualmente (Vokes et al., 1993; Mork, 1998; Greenlee et al., 2000), o que representa aproximadamente 90% das neoplasias diagnosticadas de boca (Shah et al., 2003). Os CEC apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade, com prognóstico que não se modificou nas ultimas quatro décadas (Mork, 1998; Greenlee et al., 2000), devido, entre outros fatores, ao estágio clínico avançado no momento do diagnóstico (Vokes et al., 1993) e, consequentemente, tratamentos cada vez mais agressivos.

Os principais fatores associados ao risco para o desenvolvimento do câncer de boca são o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas, principalmente aquelas de alto teor (McIntyre & Oliver, 1999; Ogden & Macluskey, 2000; Melrose, 2001; Puerto et al., 2000; Hahn et al., 2002; Maserejian et al., 2006; INCA 2007). O tabaco e o álcool têm riscos independentes, mas diretamente proporcionais às quantidades ingeridas; quando do sinergismo, o risco aumenta em até 15 vezes (Keller, 1967; Mashberg et al., 1993; Shiu&Chen, 2004; Tsantoulis et al., 2007). Além do cigarro e do álcool, dietas pobres em frutas e vegetais, agentes biológicos como o papiloma vírus humano (HPV), herpes simples, irritação mecânica crônica (ação de bordas cortantes dos dentes sobre a mucosa bucal e o uso de próteses mal-adaptadas), radiações (luz solar no caso de câncer labial), componente familiar (Goldstein et al., 1994; Copper et al., 1995; Foulkes et al., 1996; Brown et al., 2001), fatores ocupacionais (asbesto e níquel) e má higiene bucal podem, também, ocasionar alterações epiteliais que tornam a mucosa bucal mais vulnerável a agentes cancerígenos (McIntyre & Oliver, 1999; Thuler & Rebelo, 1999; Lissowska et al., 2003; Rosenquist et al., 2005; Kozamara et al., 2005; Taghavi&Yazdi, 2007; Tsantoulis et al., 2007; INCA 2007,). Levando-se em consideração a grande quantidade de indivíduos etilistas e/ou tabagistas, é importante mencionar que apenas pequena porcentagem desenvolve o câncer oral. Por outro lado, nem todos os portadores de câncer oral fazem uso do álcool e ou cigarro.

1.2 Carcinogênese

A partir de ensaios com animais de laboratório e utilizando agentes químicos, foi postulado que a carcinogênese é um processo de múltiplas etapas que são denominadas de iniciação, promoção, progressão e manifestação. A etapa de iniciação é caracterizada por lesão irreversível no DNA (mutação), induzida pela exposição a agentes genotóxicos químicos, físicos ou biológicos; a promoção é um processo mais lento, reversível e que está associada à proliferação focal de células iniciadas. Os agentes promotores, em geral, não são genotóxicos e atuam por mecanismos epigenéticos, principalmente alterando os sinais moleculares envolvidos no controle da proliferação celular (Pitot, 1991; 1993). No entanto, agentes genotóxicos podem, também, agir como promotores modificando quantitativamente o processo carcinogênico iniciado por outros agentes (De Camargo et al., 1994). A etapa da progressão é caracterizada, morfológicamente, por anaplasia e, biologicamente, por crescimento autônomo. Quando as células adquirem capacidade para invadir e metastizar, podendo as alterações serem evidenciadas clinicamente, estar-se-á diante da última etapa, a manifestação (Pitot, 1989; Nowell, 1994). Assim, todos os fatores que atuem em uma ou mais etapas do desenvolvimento neoplásico devem ser considerados para a estimativa de risco para carcinogênese (Barret, 1993; Perera & Bofeta, 1998).

Desde o século XVIII os agentes químicos são reconhecidos como fatores etiológicos do câncer no homem. Frente a isto, para um melhor entendimento da dinâmica da carcinogênese química, foram desenvolvidos testes de carcinogênese de longa duração (Gart et al., 1986; Montesano et al., 1986; Chhabra et al., 1990; Ito et al., 1991) que, apesar de boa reprodutibilidade e confiabilidade, apresentam como desvantagem o alto custo, já que necessitam da manutenção de grande número de animais em biotério por longo período (aproximadamente dois anos). Assim, os mecanismos da carcinogênese quimicamente induzida têm sido estudados por meio de modelos de média-duração, usando como parâmetros lesões no DNA (testes de mutagenicidade e genotoxicidade) e lesões pré-neoplásicas em diferentes órgãos-alvo. As alterações no DNA são denominadas biomarcadores genéticos e, geralmente, estão presentes durante os estágios iniciais da carcinogênese (Keller, 1967; Lippman et al., 1990; Nauta et al., 1996; Ribeiro et al., 2007) e são importantes não somente para a identificação precoce de processos neoplásicos, mas, também, para o entendimento do processo cancerígeno e prognóstico (Bird, 1987)

1.2.1 Carcinogênese bucal

A elaboração de modelos de carcinogênese bucal teve início com as investigações de Salley (1954) que demonstraram que os carcinomas espinocelulares poderiam ser induzidos na mucosa bucal de hamsters. Posteriormente, em 1957, utilizando a mesma metodologia para estudar a evolução da carcinogênese, foi constatada existência de pelo menos quatro estágios precedentes à neoplasia induzida: inflamação, degeneração, regeneração e hiperplasia (Salley, 1957).

Atualmente, várias substâncias vêm sendo utilizadas em modelos de carcinogênese bucal quimicamente induzida, como é o caso do DMBA (dimetilbenzantraceno), um hidrocarboneto aromático policíclico com potencial carcinogênico bem estabelecido (Fassoni et al., 1993; Li et al., 1999; Chen et al., 2003), e o benzo[a]pireno, que é um dos componentes do cigarro (Schwartz et al., 2004).

O agente alquilante 4-nitroquinolina 1-óxido (4NQO), é o agente químico adotado pela maioria dos pesquisadores em modelos de carcinogênese experimental na mucosa bucal de ratos, uma vez que induz lesões pré-neoplásicas e neoplásicas semelhantes às da cavidade bucal de seres humanos (Nauta et al., 1996; Dayan et al., 1997; Nishimura, 1999; Okazaki et al., 2002; Vered et al., 2003; Ribeiro et al., 2004 a, b; Ribeiro et al., 2007). A 4NQO, de acordo com seu mecanismo de ação, é capaz de induzir amplo espectro de lesões genéticas, tais como quebras de fita simples e duplas do DNA e sítios álcali-lábeis (Fronza et al., 1992; Okazaki et al., 2002; Vered et al., 2003). Por essas ações, a 4NQO é considerada um cancerígeno completo, ou seja, com potencial para interferir em todas as fases da carcinogênese (Okazaki et al., 2002). As alterações histopatológicas por produzidas por esta substância são progressivas e determinadas pelo tempo de exposição, e ainda caracterizadas histologicamente como hiperplasia e hiperqueratose sem displasia, hiperplasia e hiperqueratose com displasia, displasias leve, moderada e severa, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo (Nishimura, 1999).

Ribeiro, em 2005, induziu carcinogênese em língua de rato Wistar com a administração do 4NQO e observou que as lesões detectáveis do ponto de vista macroscópico ou clínico foram correlatas aos achados microscópicos. Macroscopicamente, a mucosa lingual dos animais do grupo controle apresentava-se com características de normalidade, com coloração rosa pálida. Já no grupo experimental, as alterações observadas em alguns animais surgiram somente a partir da 12^a semana após a exposição a 4NQO, e eram caracterizadas por alterações leves, ou seja, lesões iniciais de aspecto irregular, evoluindo para alterações moderadas com placa branca e superfície papilomatosa. Após 20 semanas, alguns animais apresentaram mancha branca e exofítica com superfície irregular papilomatosa ou erosiva, caracterizando

alterações graves (Figura 1). Histologicamente, a mucosa lingual dos animais do grupo controle apresentava-se com características de normalidade, com um epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado (mucosa bucal do tipo especializada) em contato com a lâmina própria formada por tecido conjuntivo frouxo pouco celular. No grupo experimental., contudo, alterações histológicas foram evidenciadas a partir da 12^a semana, sendo as lesões iniciais descritas como hiperplasia e hiperqueratose sem displasia, caracterizada por um afinamento gradual das células da camada espinhosa. Nessa fase foi encontrada, também, displasia epitelial leve e moderada. Após 20 semanas da exposição a 4NQO, o grau de severidade aumentou, sendo que na maioria dos casos foram observadas displasia severa e carcinoma *in situ*. Carcinomas microinvasivo e invasivo foram também observados nessa fase (Figura 2).

As lesões brancas induzidas pela 4NQO detectáveis macroscopicamente, assemelham-se a leucoplasia em seres humanos, que são as principais lesões pré-neoplásicas na mucosa bucal clinicamente detectáveis na prática odontológica (Neville et al., 1995; Reibel, 2003; Brenan et al., 2007, Ribeiro et al., 2007).

1.3 Lesões pré neoplásicas em mucosa oral

Lesões pré-neoplásicas são definidas como tecido morfológicamente alterado no qual o câncer poderá ocorrer mais facilmente (Shepman & van der Waal., 1995). Eritroplasia e leucoplasia são as lesões pré-neoplásicas mais comuns que precedem o carcinoma espinocelular na mucosa oral (Waldron & Shafer, 1975; Shafer & Waldron, 1975; Bouquot, 1994; Speight et al., 1996; Mashberg, 2000; Brenan et al., 2007). Entretanto, há divergência na literatura em relação à incidência das leucoplasias que se convertem em carcinoma espinocelular, ficando o índice em torno de 1,4% a 36%, em um período de 1 a 30 anos (Silverman et al., 1984; Burkhardt 1985; Hogewind et al., 1989; Lind, 1987; Lee et al., 2000; Warnakulasuriya, 2000; Saito et al., 2001, Kurokawa et al., 2002, Carinci et al., 2005). Tal diferença seja devida, talvez, à falta de padronização dos estudos (Gonzalez-Moles et al., 2000; Oliver et al., 2001; Shiu & Chen, 2003).

A leucoplasia, de acordo com Organização Mundial de Saúde (OMS), consiste em uma placa queratótica branca não raspável, que não pode ser caracterizada clínica e histologicamente como nenhuma outra lesão (WHO, 1987). Sua etiologia é desconhecida, mas está relacionada principalmente com o tabaco e o álcool (Dietrich et al., 2004; Maserejian et al., 2006). A leucoplasia oral faz parte de um grupo de lesões heterogêneas, que histologicamente pode se apresentar como uma hiperqueratose, paraqueratose, ou acantose, uma vez que 5% a 15% delas são classificadas como displasias (Suarez et al., 1998; Pindborg et al., 1997; Subdo & Reith, 2005). Em 2003, a OMS classificou a displasia epitelial oral

como leve, moderada, severa e carcinoma *in situ*, de acordo com a presença e severidade da atipia celular e alterações baseadas na espessura da camada displásica quando comparada à espessura total do epitélio normal (Barnes et al., 2005)

O acúmulo de evidências tem demonstrado que a displasia epitelial é um provável marcador biológico de malignidade, uma vez que o risco de displasias moderadas ou severas é significativamente maior quando comparado à displasia leve ou hiperplasia (Sudbo et al., 2001; Subdo & Reith; 2005; Carici et al., 2005). O marcador tradicional de prognóstico da displasia epitelial é o tipo e o grau histológico (Warnakulasuriya, 2000, 2001). A presença de displasia epitelial observada na microscopia óptica é um dos vários indicadores de prognósticos de transformação de lesões pré-malignas, pré-cancerosas ou potencialmente malignas. Entretanto, é sabido que lesões não displásicas podem transformar-se em câncer, assim como nem toda displasia torna-se maligna, pois regressão espontânea tem sido relacionada a mudanças de hábitos (tabaco) e estilo de vida (dieta) (Sankaranarayanan, 1997; Reibel, 2003). Evidências de atipias morfológicas como o aumento da razão núcleo/citoplasma, pleomorfismo e hiperchromatismo nuclear, aumento do número de mitoses bem como figuras de mitoses atípicas e distúrbios da arquitetura epitelial devem ser consideradas no processo de transformação maligna (Pindborg et al., 1997). Contudo, a análise morfológica é subjetiva e, portanto, pode haver discordância em relação ao grau de displasia epitelial oral. Isto ocorre devido não somente às variações neste tipo de lesões como, também, pela falta de objetividade e estabelecimento de critérios de avaliação, divisão arbitrária e falta de conhecimento e calibração dos critérios de gradação histológica que são importantes para a detecção do potencial maligno (Pindborg et al., 1985; Karabulut et al. 1995; Subdo et al., 2001; Warnakulasuriya, 2001; Okazaki et al., 2002; Fisher et al., 2004; Kujan et al., 2006).

Nesse sentido, a importância dos marcadores moleculares no prognóstico das lesões epiteliais potencialmente malignas, principalmente as leucoplasias, tem sido evidenciada nos últimos anos (Scully&Burkhart, 1993; Lippman&Hong, 2001; Sidransky, 2002), pois a progressão maligna ocorre por meio dos graus crescentes da displasia, resultado do acúmulo de diversas alterações genéticas e moleculares (Vogelstein & Kinzler, 1993; Scully et al., 2000 a,b).

Alterações genéticas como aneuploidia, perda de heterozigose, desregulação de apoptose, expressão gênica aberrante têm sido associadas com a progressão da displasia epitelial para o carcinoma espinho celular (Zang&Rosin, 2001; Subdo et al., 2001 a,b; Kovesi & Szende, 2002; Subdo et al., 2004; Van Houten et al., 2004; Brennan et al., 2007; Tsantoulis et al., 2007). Desta forma, a identificação de marcadores de progressão das displasias orais é alvo importante e necessário para se definir diagnóstico, tratamento e prognóstico da doença.

Contudo, não há um único marcador universalmente aceito, e sim um painel com número limitado de genes e proteínas que podem ter papel relevante na progressão dessas lesões (Scully & Burkhardt, 1993; Warnakulasuriya, 2000; Oliver et al., 2000; Sidransky, 2002, Carinci et al 2005).

1.4 Gene Supressor Tumoral *TP53*

No processo de carcinogênese encontram-se envolvidos muitos genes, dentre os quais os responsáveis pela regulação da estabilidade e reparo do DNA e crescimento celular, que são denominados de genes supressores tumorais. Fazendo parte deste grupo, destaca-se o gene *TP53*, cuja mutação ou inativação esta relacionada com o aparecimento do câncer, pois pode levar ao aumento de uma população células geneticamente alteradas (Harris & Hollstein, 1993; Yonish-Rouach, 1997). Estudos mostram que mutações no gene estão presentes em aproximadamente 60% das neoplasias humanas (Cavalcante, 2002) e de 50% a 60% nos tumores malignos de cabeça e pescoço (Hollstein et al., 1991).

O gene *TP53* (*tumor protein 53*) foi descrito pela primeira vez em 1979, e foi inicialmente erroneamente classificado como oncogene devido sua habilidade para a transformação celular ((Yonish-Rouach, 1997; Mowat, 1998). Este gene é constituído por 20 kilobases e encontra-se localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) em seres humanos e no cromossomo 10 em murinos (Linzer & Levine, 1979; Canzian et al., 1996); possui 4 domínios funcionais que estão envolvidos na regulação da transcrição, união com DNA, oligominização e auto inibição (Nylander et al 2000). Em seres humanos e em camundongos, o *TP53* possui 11 exons intercalados por 10 introns (Isobe et al 1986), e em ratos 10 exons (Figura 3). Há dados que mostram que 80% a 90% dos casos de câncer humano são devidos a inativação do gene *TP53* causada por mutações nos exons 5 a 8 (Hollstein et al., 1991; May & May, 1999); o exon 4, por exemplo, está envolvido na indução de apoptose (Zhu et al., 1998).

A primeira mutação no gene *TP53* em um indivíduo com câncer foi relatada em 1989 (Nigro et al 1989). Estudos têm mostrado que em mais da metade de todos os tumores malignos em seres humanos há perda de função deste gene (Volgelstein, 1990; Levine et al., 1991), sendo que, os tumores que apresentam *TP53* mutado são mais agressivos e frequentemente resistentes a radioterapia e a quimioterapia. As mutações que geram modificações na região de domínios de interação do *TP53* com o DNA, ou que alteram a estabilidade da proteína promovem prejuízo da atividade do gene e podem contribuir para o desenvolvimento de câncer (Baker et al., 1989; Bullock&Fresht, 2001).

Pesquisas têm demonstrado expressões aberrantes do gene *TP53* em 28% das hiperplasias epiteliais benignas, 57% nas displasias médias, 55% nas moderadas, 71% severas (Ichikawa et al., 1997) de 15 a 76% nos carcinomas orais (Ichikawa et al., 1997; Chomchai, 1999; Xie et al., 1999; Kudo 2000; Ostwald 2000; Braakhuis et al., 2002; Whyte et al., 2002; Kozamara et al., 2005). Mais de 50% dos carcinomas espinocelulares oral são positivos para proteína p53, e mutações do *TP53* (Nylander et al., 2000), e também, há superexpressão da proteína e mitógeno em áreas de displasia severa adjacente ao carcinoma (Carince et al., 2005). De acordo com o grau histológico do tumor, a mutação do *TP53* foi detectada em 56% dos tumores grau I, sendo significativamente maior que graus II e III. Tumores com aumento do grau nuclear (NG3) também apresentaram aumento maior na incidência de mutação *TP53* do que tumores com NGI e NGII (Kozamara et al., 2005).

Atualmente, há três vias geneticamente distintas para a ativação do gene *TP53*. Primeiro, o estímulo oncogênico por meio da proteína supressora de tumor p14^{ARF}, a qual se une à proteína MDM2 e forma um complexo com MDM2/p53 causando a liberação da p53 no núcleo impedindo sua degradação no citoplasma (Lowe&Rulley, 1993-1007); segundo, mecanismo através das radiações ionizante, e o terceiro através da hipoxia (Graeber et al., 1996-1007), citocinas e fator de crescimento (Canman et al., 1995; Vogelstein et al., 2000).

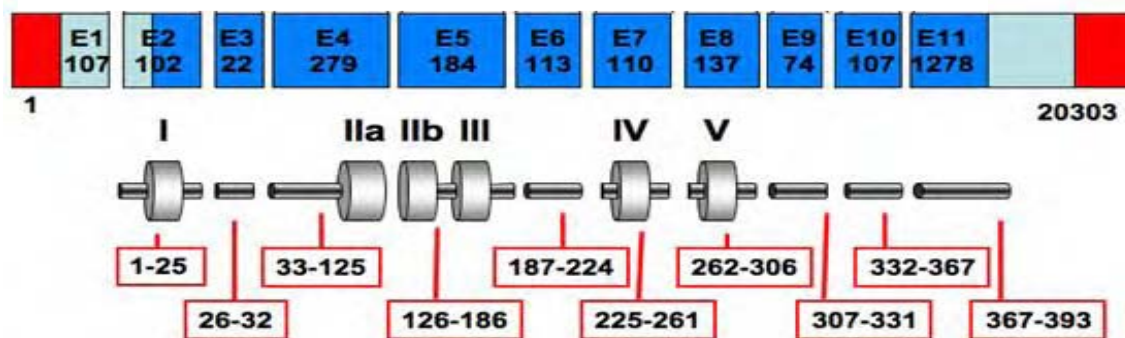


Figura 3: estrutura do gene *TP53*, modificado de Prokocimer&Rotter, 1994

1.5 Proteína p53

A proteína p53, codificada pelo gene *TP53*, consiste de uma fosfoproteína nuclear de peso molecular equivalente a 53KDa, que contém uma seqüência de 393 aminoácidos (May & May, 1999). A forma funcionalmente ativa, denominada de selvagem, apresenta estrutura molecular tetramérica, ou seja, com quatro subunidades básicas idênticas que se unem constituindo a forma ativa da molécula (Wolkowicz & Ruttoter, 1997; Yonish-Rouach, 1997; Mowat, 1998). Cada subunidade é constituída por quatro regiões (domínios) que representam unidades funcionais distintas e com funções diferentes. O primeiro segmento, região amino-terminal (N-terminal), é composto por 80 aminoácidos e está relacionado com a ativação de genes específicos; o segundo domínio, situado entre os aminoácidos 100 e 300, corresponde à parte central da proteína que se liga a sítios específicos da molécula de DNA; a região carboxi-terminal (C-terminal), que possui dois domínios, o da tetramerização, responsável pela formação dos tetrâmeros compreendido entre os aminoácidos 319 a 360, e o regulatório, compreendido entre os aminoácidos 364 a 393, que pode regular negativamente a parte central da molécula que se une ao DNA, e, com isso, inibir a união da proteína p53 a diferentes promotores (Prokocimer & Rotter, 1994; Nylander et al., 2000; Bullock & Fersht, 2001) (Figura 4).



Figura 4: estrutura da proteína p53, modificado de Prokocimer&Rotter, 1994

A proteína p53 é considerada um fator de transcrição e é expressa quando ocorre agressão ao genoma. Os genes regulados pela p53 são os envolvidos na parada do ciclo celular, apoptose e angiogênese (Levine, 1997; [Vogelstein B et al, 2000](#)). Em condições de estresse, particularmente por indução de dano no DNA, a proteína p53 selvagem promove a parada do ciclo celular na fase G1, permitindo, desta forma, o reparo do DNA danificado pelo agente mutagênico. Se, por algum motivo, este mecanismo falhar, a p53 sinalizará para célula entrar em apoptose, impedindo, assim, que células mutadas se dividam (Cox & Walker, 1996). As funções da proteína p53 são exercidas por sua capacidade transcrricional que ativa uma série de genes envolvidos na regulação do ciclo celular. A forma mutada é incapaz de controlar a proliferação celular, resultando em reparo ineficiente do DNA e permitindo que

muitas células expostas a agentes mutagênicos repliquem o DNA danificado, deixando, assim, as mutações incorporadas ao genoma (Rotter & Prokocimer, 1991; Cotran et al., 1994); Almong&Rotter, 1998). Embora uma única mutação não seja suficiente para transformar uma célula, a perda de função da p53 predispõe as células a mutações adicionais e a transformação maligna (Lavieille et al., 1998).

Algumas formas mutantes do gene *TP53* não apenas perdem sua função normal, mas, também, ganham a habilidade de inativar a proteína p53 selvagem. Quando uma célula se apresenta com um alelo do gene *TP53* selvagem e outro mutante, a função da proteína fica comprometida, uma vez que a maioria dos tetrâmeros da molécula apresentará pelo menos uma das subunidades alterada (Harris & Hollstein, 1993), e, com isso, a célula funciona como se não tivesse qualquer função supressora. Mutações deste tipo são denominadas dominantes (Cotran et al., 1994).

Quando a célula é exposta à agressão genotóxica por agentes químicos ou radiação UV, o gene *TP53* ativa transcricionalmente o gene *TP21*, induzindo a síntese da proteína com o mesmo nome, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDKs), fazendo com que as células parem na fase G1 do ciclo celular até que o DNA seja reparado. A seguir, a proteína p53 ativa o gene *GADD-45* que atua corrigindo a lesão do DNA. Assim que o DNA for reparado, a proteína p53 é degradada pela ação da proteína MDM-2 (Morgan & Ksatan, 1997; Prive, 1998).

Mutações no gene *TP53* levam à produção de proteína alterada, com meia vida longa, sem capacidade de se combinar com o DNA e que se acumula no núcleo celular, sendo facilmente visualizada por métodos imunoistoquímicos. Em contra partida, a p53 selvagem tem meia vida curta (6-20min), não se acumula em células normais e tem mostrado induzir apoptose e inibição de crescimento, dependendo das circunstâncias fisiológicas (Okazaki et al., 2000; Kurokawa et al., 2003; Kozamara et al., 2005), gerando níveis de proteínas abaixo do limiar de detecção pela imunoistoquímica (Nakopoulou et al., 1998). Além disso, a inativação do gene *TP53* favorece o acúmulo de mutações e instabilidade genômica. A maioria das mutações do gene *TP53* é do tipo *missense* e prolongam significativamente a meia vida da proteína (Oren, 1992), permitindo a sua detecção. Este tipo de mutação ocorre entre os códons 120 e 290 situados entre os exons 5 e 9 e resulta, com frequência, na transcrição de uma proteína não funcional. (Hernandez-Boussard et al., 1999; Soussi, 2000). Entretanto, 10% - 15% de mutações no gene *TP53* são do tipo *nonsense* ou microdeleções que podem levar à transcrição de uma proteína truncada e também não funcional o que não gera níveis detectáveis (Soussi, 2000). A mutação varia com o tipo de câncer, entretanto certos *hot spots*,

ou sítios de mutações, têm sido identificados nos códons 175, 245, 248, 249, 273 e 282 (Figura 5).

A expressão da proteína p53 tem sido associada ao grau de displasia epitelial bem como à progressão para carcinoma espino celular (Levine, 1997; Vera-Sempere & Navarro-Hervas, 1997; Cruz et al., 1998; Cotran et al., 1999; Sulkowska et al., 2001; Valente et al., 2001; Okazaki et al 2002; Kurokawa et al 2003, Santos-Garcia et al 2005, Abbas et al., 2007; Brennan et al., 2007).

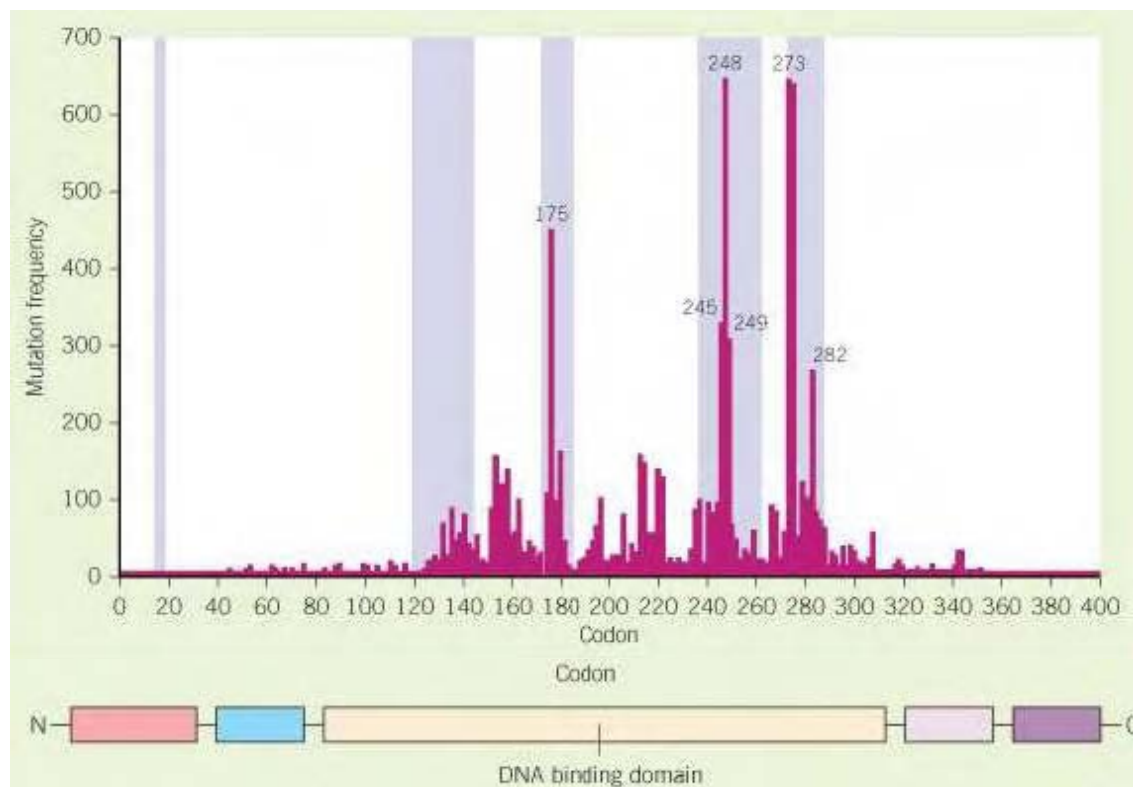


Figura 5: sítios e frequência de mutações do gene *TP53* para todos os cânceres. Hernandez-Boussard et al, 1999.

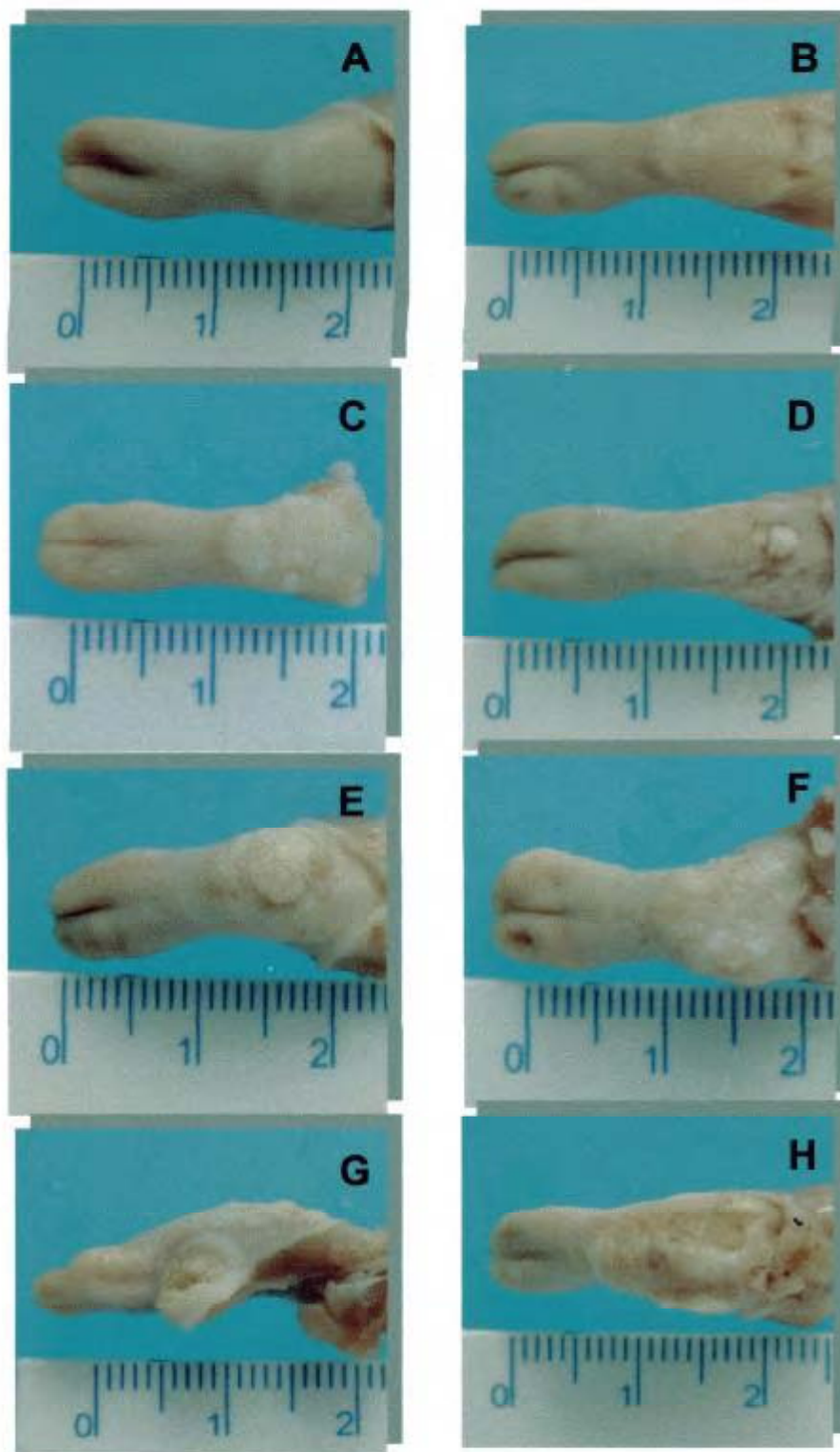


Figura 1: Aspecto macroscópico da superfície dorsal da língua na evolução da carcinogênese. (A) Mucosa lingual normal. (B) Aspecto irregular caracterizando alterações leves. (C) Aspecto irregular com alterações moderadas caracterizadas por placas brancas (leucoplásicas) e superfície papilomatosa. (D) Aspecto irregular com alterações graves, com superfície ora papilomatosa ora erosiva. (E) Lesão exófitica. (F) Placa leucoplásica comprometendo toda a superfície posterior da língua. (G) Lesão erosiva na borda lateral da língua. (H) Lesão erosiva com mancha vermelha (eritoplásica) comprometendo a porção posterior da língua.

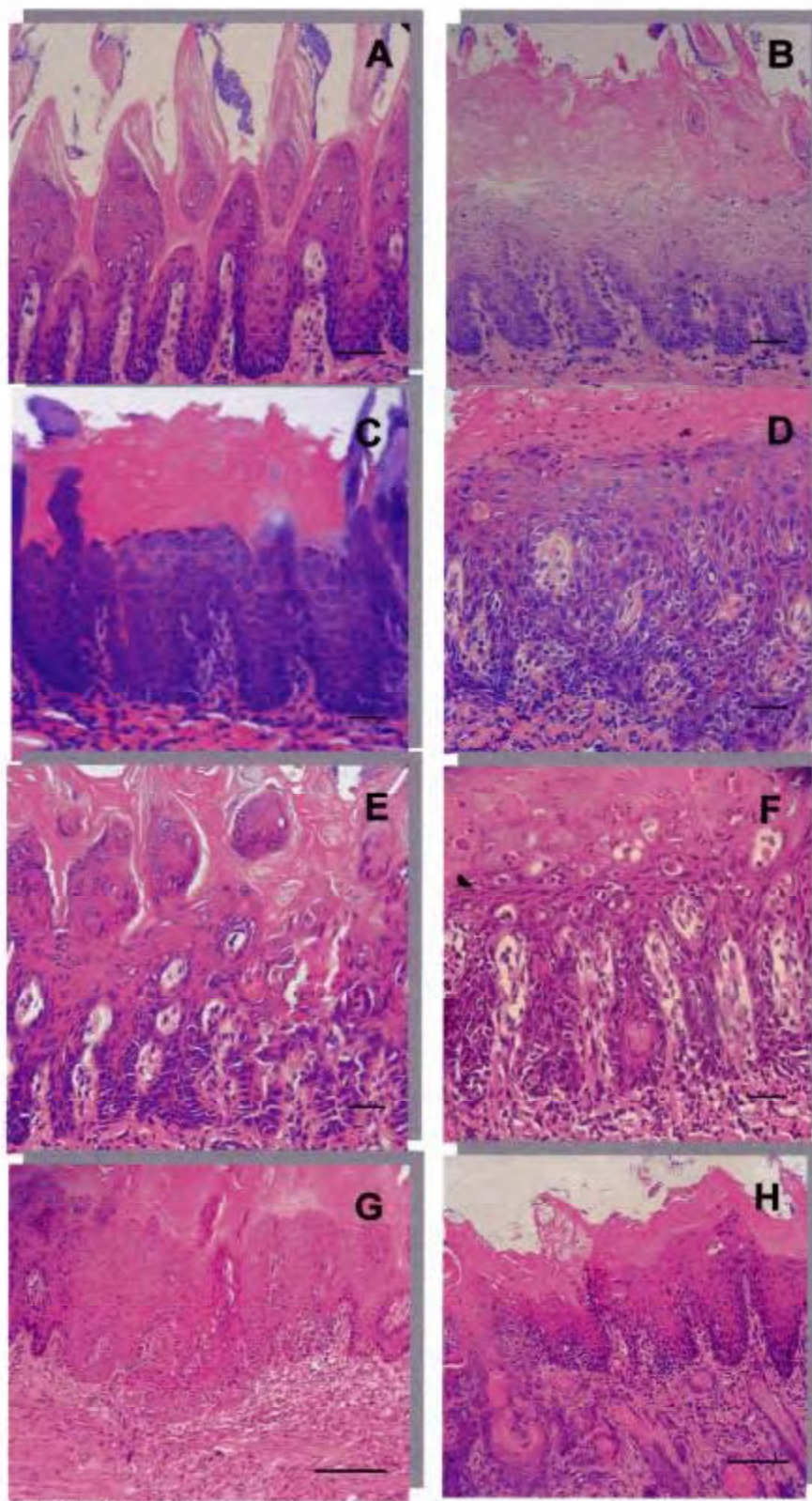


Figura 2: Análise histopatológica durante a evolução da carcinogênese. (A) Mucosa lingual normal do dorso da língua. (B) Hiperplasia e hiperqueratose sem displasia. (C) Hiperplasia e hiperqueratose com displasia leve. (D) Hiperplasia e hiperqueratose com displasia moderada. (E) Hiperplasia e hiperqueratose com displasia severa. (F) Carcinoma in situ. (G) Carcinoma espinocelular microinvasivo. (H) Carcinoma espinocelular bem diferenciado invasivo. (H.E.) Barra=50 μ m

2. OBJETIVO

Considerando o descrito, o presente estudo teve por objetivo investigar e comparar o papel do da proteína p53 e do gene supressor tumoral **TP53** durante a carcinogênese experimental quimicamente induzida pela 4 NQO em língua de rato Wistar, utilizando métodos imunistoquímicos e seqüenciamento de DNA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O material biológico (amostras de tecido normal e de carcinoma espinocelular de boca) utilizado neste estudo foi gentilmente cedido pelo Dr. Daniel Araki Ribeiro a partir de pesquisa anteriormente realizada para a padronização do modelo de média-duração de carcinogênese oral quimicamente induzida pela 4 NQO em ratos Wistar.

3.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental realizado e cujos resultados foram publicados por Ribeiro et al. (2007) é resumidamente apresentado a seguir. Ratos Wistar machos, com 8 semanas de idades foram distribuídos em dois grupos de 30 animais cada (grupos 1 e 2). Para cada um dos grupos, 10 animais foram sacrificados em três diferentes momentos: 4 (A), 12 (B), ou 20 (C) semanas após o início do experimento (Figura 6).

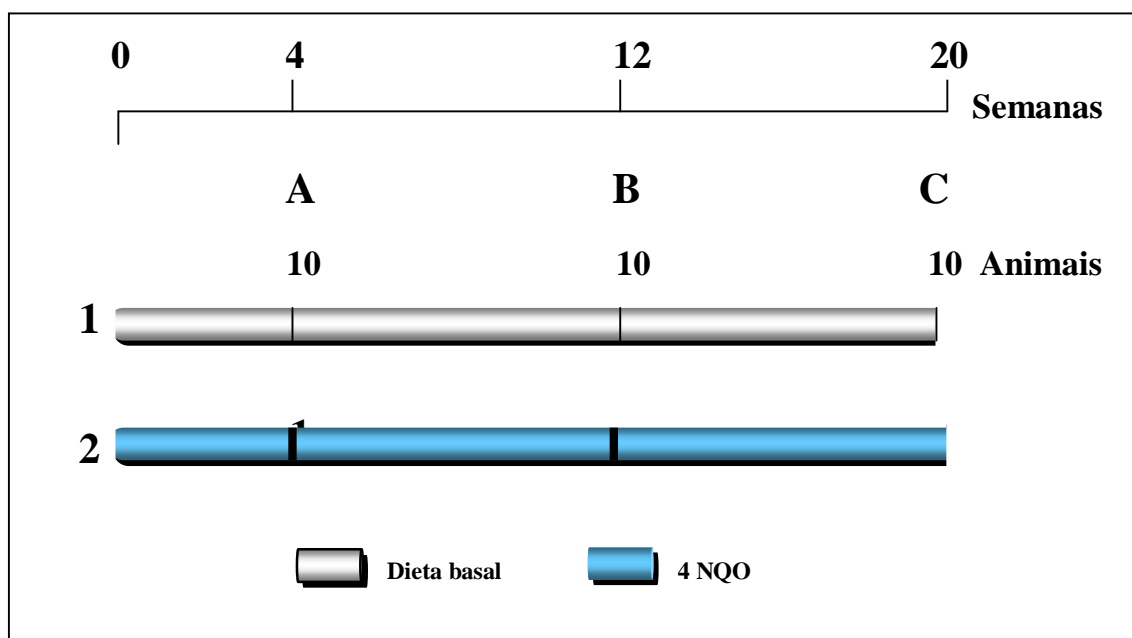


Figura 6 – Delineamento experimental do modelo de carcinogênese bucal quimicamente induzida pela 4NQO (modificado de Ribeiro et al., 2007). Grupo 1A, B, C – controle negativo que recebeu apenas água e ração *ad libitum*; grupo 2 A, B, C – tratado com 50 ppm de 4NQO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), via água de beber.

3.2 Análise imunoistoquímica

Para a avaliação da expressão gênica em tecidos bucais, foram utilizados marcadores imunoistoquímicos da proteína do gene *TP53*. Para isso, cortes de 5 μ m foram tratados com proteinase K por 30 minutos, em temperatura ambiente. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 2%, por 10 minutos, e lavados em PBS (*phosphate buffer solution*). Após esse período, para a proteína p53, foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-p53 (Novocastra, Newcastle, UK). Este anticorpo é capaz de detectar a proteína selvagem e

mutada do gene *TP53*. Todos os anticorpos primários foram incubados em temperatura ambiente, por 24 horas, e lavados com PBS por 30 minutos, por três vezes. Isso feito, os cortes foram incubados com o anticorpo secundário por 30 minutos e, em seguida, corados com o DAB (diaminobenzidina) (DAKO, Lab.) e contra-corados com a hematoxilina de Harris. Para controle negativo foi omitido o anticorpo primário; para o controle positivo foram utilizados linfonodos normais. Após realizada a marcação, foram avaliados 10 campos por lâmina, 50 campos por animal, em aumento de 400X, por sistema de casualização sistemática. Um total de 1000 células foi avaliada para cada animal, sendo os valores expressos em percentagem.

3.3 Extração de DNA

Para a extração de DNA foram utilizadas as amostras parafinadas e processadas histologicamente. Foram feitos de 10 a 15 cortes histológicos sucessivos de 6 µm de espessura, os quais foram desparafinizados em 750 µL de xilol, a temperatura ambiente, por um período de incubação de 2 horas a 48°C em banho maria. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13.200 rpm. A seguir, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e feita a hidratação da molécula de DNA com 500 µL de EtOH 100%, homogenizado por inversão e novamente centrifugado por 15 minutos a 13.200 rpm. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente e esse processo foi repetido com 500 µL de EtOH 70% e 50%, respectivamente. A seguir, foi feita a desagregação mecânica e enzimática do tecido acrescentando-se 30 uL de SDS 10%, proteinase K 1%, na concentração final 100 µg/mL e 270 µL de tampão de extração (10mM de Tris-HCl pH 9, 1mM de EDTA pH 8), sendo incubadas a 48°C por 48 h. A cada 8 horas eram adicionados 5 uL de proteinase K 20%. A seguir, acrescido 300 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) pH 8, e as amostras centrifugadas por 10 minutos a 13.200 rpm. Posteriormente, foi feita a transferência do DNA para novos microtubos, nos quais foram acrescentados 750 uL de EtOH 100% gelado, 100 uL de acetato de amônio 7,5 M, 2 uL de glicogênio 20mg/mL. As amostras foram homogeneizadas por inversão e deixadas precipitando a -20°C *overnight*. A seguir, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 12.000 rpm em centrífuga refrigerada à 4°C. O sobrenadante foi retirado e os tubos invertidos em posição vertical para serem secos a temperatura ambiente. O DNA foi suspenso em 30 uL de água *Mili Q* autoclavada e armazenado a -20°C.

3.4 Amplificação do gene *TP53* murino por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

O conjunto de oligonucleotídeos iniciadores foi selecionado com base na literatura, por serem esses os mais frequentemente envolvidos na carcinogênese bucal humana (Hollstein et al., 1991). As reações da PCR foram realizadas em termociclador *Peltier Thermal Cycler PTC-200*, em volume final de 25 μ L, contendo dNTPs, tampão de amplificação, cloreto de magnésio, enzima *Taq-polimerase* de alta fidelidade e os *primers sense* e *antisense*. Para cada exon amplificado foi estabelecido um protocolo rápido com condições de reação e perfil de ciclagem (Figura 7, Tabela 1).

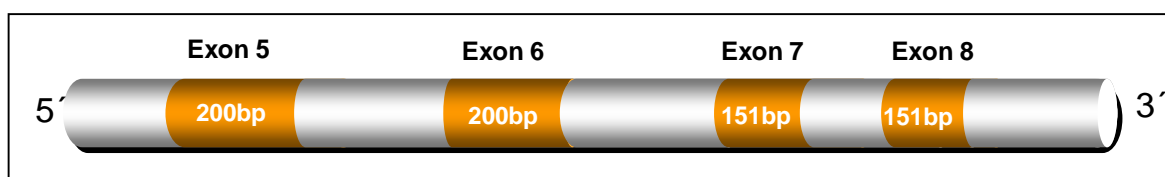


Figura 7- Estrutura do gene TP 53

Os produtos de amplificação foram separados após eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% e visualizados após coloração com nitrato de prata (Sanguinetti et al., 1994).

A análise e interpretação dos resultados foram feitas por estudos quantitativos, segundo a presença ou ausência de produto amplificado após eletroforese

3.5 Sequenciamento de DNA

3.5.1 Purificação

Os produtos da PCR dos genes *TP53*, exons 4 a 8, foram purificados utilizando o protocolo de produto de PCR *in house*. Ao produto da PCR foi adicionado etanol 95% gelado a 4°C na proporção de 20/80. A seguir, as amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) por 2 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas por 45 minutos a 13.000 rpm a temperatura ambiente, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e adicionado 250 μ L de etanol 70%. Após nova centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente e o sedimento seco por 2 minutos em *Termo Bloco* a 90°C. O DNA foi então suspenso em 10 μ L de água *Mili Q* autoclavada e armazenado a -20°C.

O produto da PCR purificada foi quantificado utilizando eletroforese em gel de agarose 2%, e comparado com *ladder* de 100 pb, para, então, ser submetido a reações de sequenciamento genético.

3.5.2 Reação de marcação de fluorescente

Os produtos das PCR purificadas foram submetidos à reação de marcação de fluorescência utilizando bases marcadas com corantes fluorescentes (*Kit BigDye Sequence Terminator v. 3.0*). As duas cadeias complementares de DNA foram seqüenciadas utilizando os mesmos *primers* da reação inicial de amplificação. As reações de marcação de fluorescência foram realizadas em termociclador (MJ Research, INC, Modelo PTC-100™), com volume final de 20 µL em que foram utilizados *Big Dye* (Versão 3.1), tampão 5 X, 3,2 mM/µL dos *primers sense* e *antisense*. Para cada éxon amplificado foi estabelecido um protocolo rápido com condições de reação e perfil de ciclagem (Tabela 2).

3.5.3 Precipitação em placa

Após a PCR de marcação de fluorescência, as amostras foram precipitadas em placa adicionando-se 80 uL de isopropanol 75% e agitando-se no vortex por aproximadamente 1 minuto. A seguir, a placa foi embrulhada em papel alumínio e deixada em repouso, a temperatura ambiente, por 15 minutos, para então ser centrifugada a 2000 rpm por 45 minutos. Após esse período o sobrenadante foi desprezado por inversão, acrescentado 170 µL de etanol 70% e centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado por inversão e a placa seca sem tampa em termociclador a 90°C por 2 minutos. Na seqüência, as amostras foram ressuspendidas, foram adicionados 10 uL de formalina deionizada e a placa agitada em *Vortex* por 1 minuto, para então serem centrifugadas a 700 rpm por 1 minuto. Por fim, foi realizada a desnaturação das amostras colocando-se a placa no termociclador por 3 minutos a 95°C e logo em seguida no freezer por 2 minutos para então ser colocada no seqüenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer* - modelo 3100.

3.6 Análise das seqüências

Todas as seqüências do gene *TP53*, exons 5 a 8, foram visualizadas e editadas com a utilização do programa *Bioedit 7.0*, por inspeções visuais e análises simultâneas das seqüências e seus respectivos cromatogramas. Essa etapa foi de especial importância para identificação de possíveis erros de leitura eletrônica e sua posterior correção. Em seguida, as seqüências foram comparadas às seqüências homólogas de ratos Wistar (Tabela 3), armazenadas no *GenBank* para a confirmação da homologia do fragmento amplificado. Para essa etapa utilizou-se o programa *Blast* (Altschusl, 1990).

3.7 Análise estatística

A detecção de diferenças estatísticas na expressividade dos genes supressores tumorais, foi feita utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis; para individualização, foi empregado o teste de Dunn's. Em todas as análises foi adotado o valor $p < 0,05$ para significância estatística.

3.8 Questões éticas

O presente estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em 8 de junho de 2005 (Protocolo n. 470/05) e 30 de agosto de 2007 (25/2007) (anexos 1 e 2).

Tabela 1 – Oligonucleotídeos iniciadores e condições de amplificação do gene *TP53* para a análise em MSP

Exons	Seqüência do iniciador	Condições da reação	Tamanho do amplicon (pb)
5	5'-ACTCAATTTCCTCAATAAGCTG-3' 5'-GCAGTGCCCCAGTGCTCAC-3'	94°C- 5 min, 94°C - 30 seg, 60°C- 30 seg, 72°C -1 min (35 X), 72°C -7 min, 4°C- 00 Tampão 1X, MgCl ₂ 1,5 mM, DNTP 0,20 mM, iniciadores 0,20 mM cada e Taq polimerase Gold IU/ul	200
6	5'-TCTTATCCGGGTGGAAGAAA-3' 5'-GAGTCTTCCAGCGTGATGATG-3'	94°C- 5 min, 94°C - 30 seg, 58°C- 30 seg, 72°C -1 min(40 X), 72°C -7 min, 4°C- 00 Tampão 1X, MgCl ₂ 2,0 mM, DNTP 0,20 mM, iniciadores 0,20 mM e Taq polimerase Gold IU/ul	200
7	5'-CCCCGGTAGTGGGAATCTTCT-3' 5'-GCTCACCTCTCTTTGCACTCC-3'	94°C- 5 min, 94°C - 30 seg, 60°C- 30 seg, 72°C -1 min(35 X), 72°C -7 min, 4°C- 00 Tampão 1X, MgCl ₂ 1,5 mM, DNTP 0,20 mM, iniciadores 0,20 mM cada e Taq polimerase Gold IU/ul	151
8	5'-AGGTGAGCAGGCAGGACAAAG-3' 5'-TAAGGGTGAAATATCTCCATCGA-3'	94°C- 5 min, 94°C - 30 seg, 61°C- 30 seg, 72°C -1 min(30 X), 72°C -7 min, 4°C- 00 Tampão 1X, MgCl ₂ 1,5 mM, DNTP 0,20 mM, iniciadores 0,20 mM cada e Taq polimerase Gold IU/ul	151

Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores e condições das reações de marcação de fluorescência para o gene *TP53*

Exons	Seqüência do iniciador	Condições da reação
5	5'-ACTCAATTTCCTCAATAAGCTG-3' 5'-GCAGTGCCCGAGTGCTCAC-3'	95°C- 5 min, 96°C - 10 seg (35X), (1°C/seg até atingir 53°), 60°C -5 seg ,(1°C/seg até atingir 60°), 60°C- 4 min , 4°C oo.
6	5'-TCTTATCCGGGTGGAAGGAAA-3' 5'-GAGTCTCCAGCGTGATGATG-3'	95°C- 5 min, 96°C - 10 seg (35X), (1°C/seg até atingir 53°), 58°C -5 seg ,(1°C/seg até atingir 60°), 60°C- 4 min , 4°C oo.
7	5'-CCCCGGTAGTGGGAATCTTCT-3' 5'-GCTCACCTCTCTTGCACCTCC-3'	95°C- 5 min, 96°C - 10 seg (35X), (1°C/seg até atingir 53°), 60°C -5 seg ,(1°C/seg até atingir 60°), 60°C- 4 min , 4°C oo.
8	5'-AGGTGAGCAGGCAGGACAAAAG-3' 5'-TAAGGGTGAAATATTCATCGA-3'	95°C- 5 min, 96°C - 10 seg (35X), (1°C/seg até atingir 53°), 61°C -5 seg ,(1°C/seg até atingir 60°), 60°C- 4 min , 4°C oo.

Tabela 3 – Sequência selvagem de rato Wistar dos exons 5 a 8 do gene *TP53*

Exon 5	<p>ACTCAATTTCCCTCAATAAAGCTGTTCTGCCAGCTGGCGAAGACATGCCCTGTGCAGTTGTGGGTCACTCCA CACCTCCACCTGGTACCCGTGTCCTCCATGGCCATCTACAAGAAGTCAACAACACATGACTGAGGTCTGTGAG ACGCTGGCCCCACCATGAGCGTTGCTCTGTATGGTGACGGTGAGCACTGGGCACTGC</p>
Exon 6	<p>TCTTATCCGGGTGGAAAGGAAATCCGTATGCTGAGTATCTGGACGACAGGCAGACTTTTCGGCACAGCGTGG TGGTACCGTATGAGCCACCTGAGGTCGGCTCCGACTATACCACTATCCACTACAAGTACATGTGCAACAGCTC CTGCATGGGGGCATGAACCGCCGCCCATCCTTACCATCACTACCGTGGAGACTC</p>
Exon 7	<p>CCCCGGTAGTGGGAATCTTCTGGGACGGGACAGCTTTGAGGTTCTGTTGTGCCCTGTCCCTGGGAGAGACC GTCGGACAGAGGAAGAAATTTCCGCAAAAGAGAGCATTGCCCGGAGCTGCCCCAGGGAGTGCAAAG AGAGGTGAGC</p>
Exon 8	<p>AGGTGAGCAGGCAGGACAAAGAAGGTGGAGGCCCTTCAGCTTCAACCCCAAAGTCAACCCCTTGCTCTCTC CTTCCATAGCACTGCCACCAGCACAAAGCTCCTCTCCCCAGCAAAAGAAAACCACTCGATGGAGATATT TCACCCCTTA</p>

Negrito: seqüências dos primers utilizados

4. RESULTADOS

Imunoistoquímica

A expressão da proteína p53 foi somente nuclear. No epitélio normal, representado pelo grupo controle, a expressão da p53 foi praticamente nula. Resultados semelhantes foram observados no grupo de animais que foram sacrificados 4 semanas após a exposição a 4 NQO, uma vez que neste período nenhuma mudança histológica foi também detectada. Entretanto, a expressão da p53 foi identificada nas células da camada basal e supra-basal do epitélio nos grupos sacrificados 12 e 20 semanas de exposição ao carcinógeno, ou seja, tanto no epitélio displásico quanto no carcinoma já instalado (Figura 8). A análise mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos grupos experimentais de 12 e 20 semanas, quando comparados com o controle e com o grupo de 4 semanas (Figura 9).

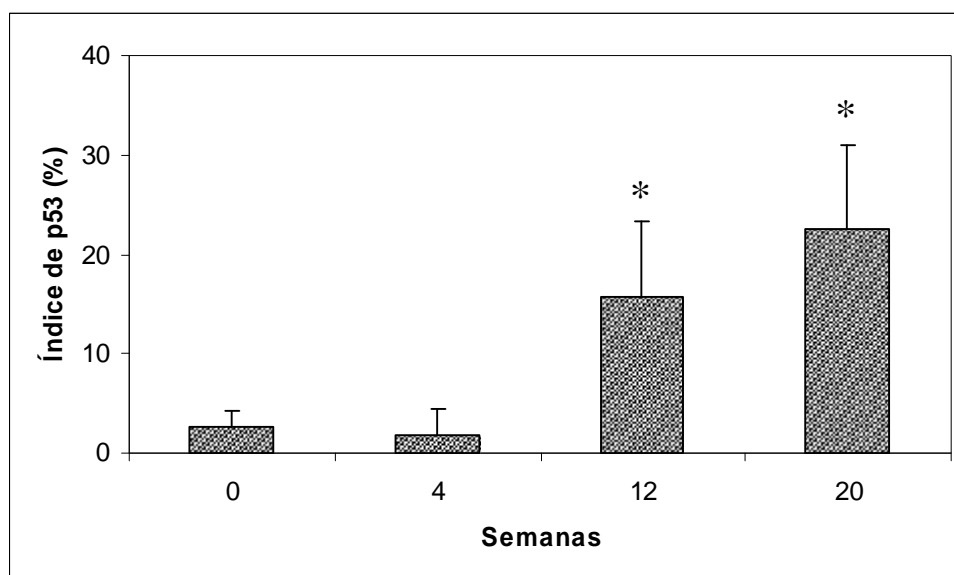


Figura 9. Índice da p53 no grupo controle negativo (0) e nos grupos de ratos expostos a 4NQO e sacrificados após 4, 12 ou 20 semanas. * $p < 0,05$, quando comparado ao controle negativo.

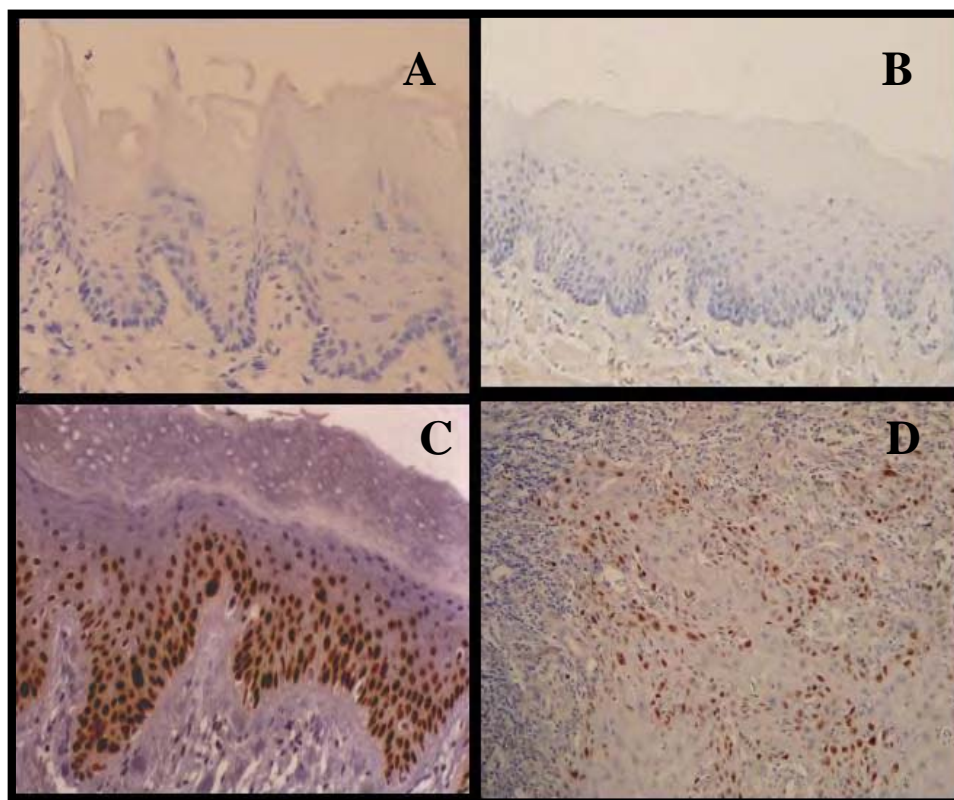


Figura 8. Marcação imunohistoquímica da proteína p53 em tecido da mucosa bucal de ratos: (A) normal; (B) hiperplasia; (C) displasia e (D) carcinoma espinocelular bem diferenciado (aumento 100 X).

Amplificação do gene TP53 por PCR (Polymerase Chain Reaction)

Os produtos de amplificação dos exons 5 a 8 do gene *TP5* separados por eletroforese em gel de poliacrilamida e visualizados por coloração com nitrato de prata são apresentados na Figura 10.

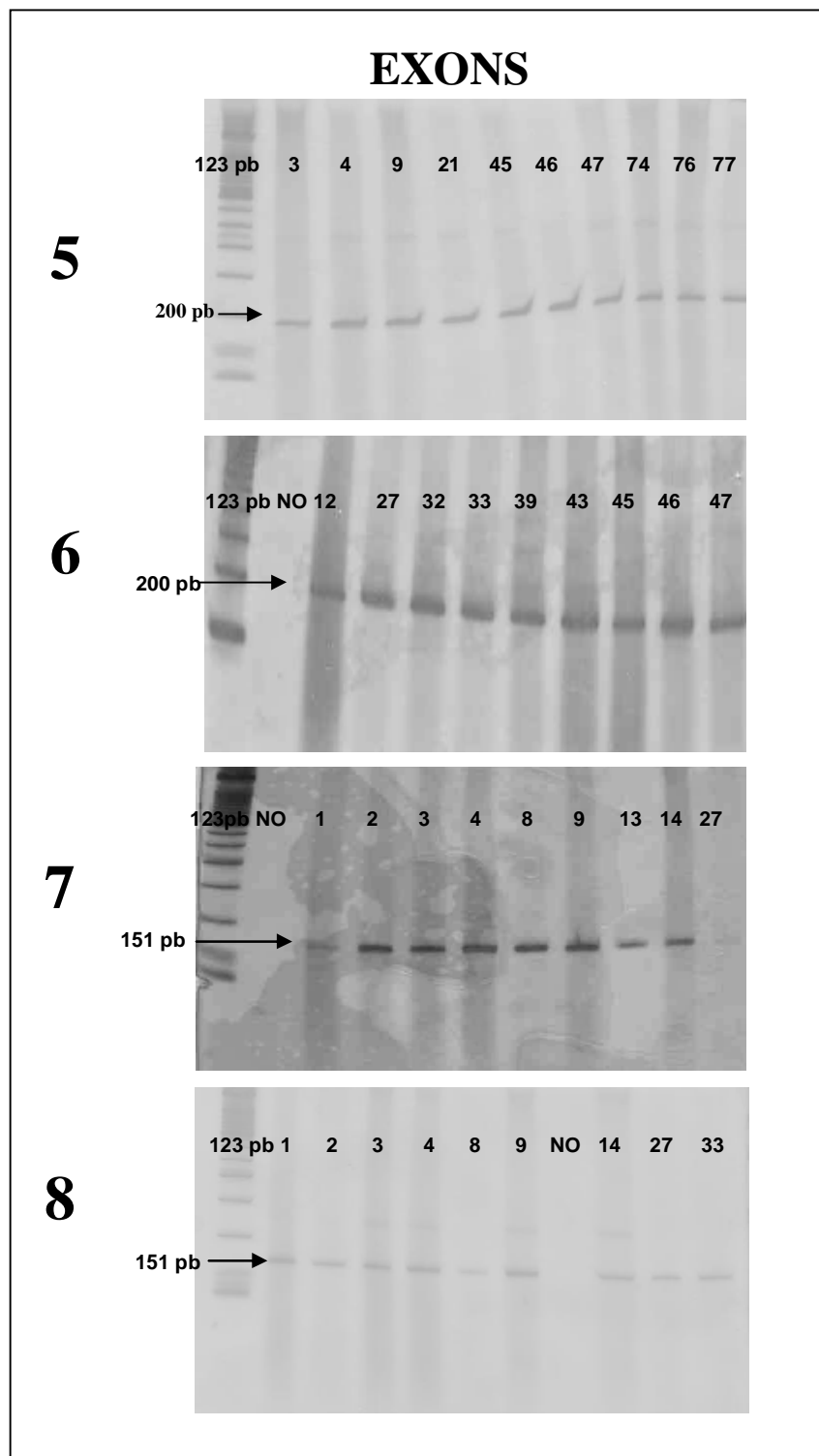


Figura 10: Padrão de bandas encontrado para o gene *TP53* exons 5, 6, 7 e 8, em gel de poliacrilamida 7%

Sequenciamento do DNA para detecção de mutação nos exons 5 a 8 do gene TP53

Os cromatogramas obtidos após o sequenciamento foram bastante claros e conclusivos. Todas as amostras apresentaram seqüências idênticas à selvagem (publicadas no *Gene Bank*), indicando, portanto, que não apresentavam nenhuma mutação na região nos exons 5 a 8 do gene *TP53* das amostras estudadas (Figuras 11A, B e 12).

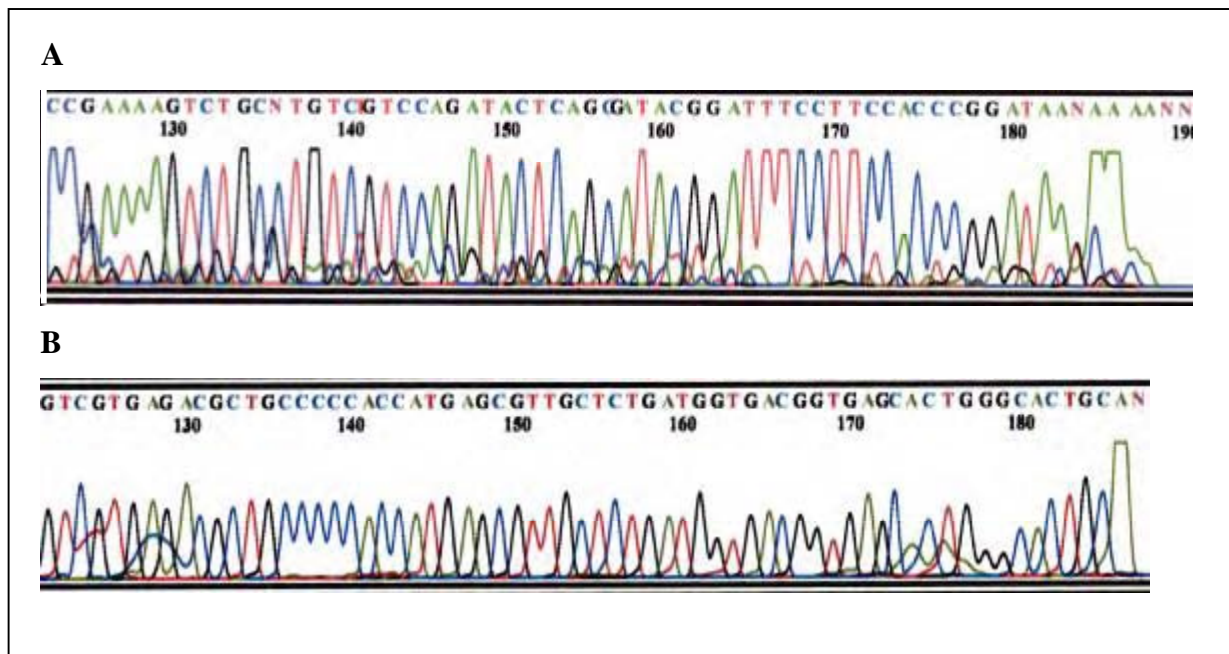


Figura 11 A e B: Cromatogramas representando seqüências forward e reverse, respectivamente, da região amplificada do éxon 6 do gene *TP53*.

Query	4	GAGTCTTCCAGCGTGATGATGGTAAGGATGGGCCGGCGTTCATGCCCCCATGCAGGAG	63
Sbjct	201	GAGTCTTCCAGCGTGATGATGGTAAGGATGGGCCGGCGTTCATGCCCCCATGCAGGAG	142
Query	64	CTGTTGCACATGTACTTGTAGTGGATAGTGGTATAGTCGGAGCCGACCTCAGGTGGCTCA	123
Sbjct	141	CTGTTGCACATGTACTTGTAGTGGATAGTGGTATAGTCGGAGCCGACCTCAGGTGGCTCA	82
Query	124	TACGGTACCACCACGCTGTGCCGAAAAGTCTGCCTGTCGTCCAGATACTCAGCATACGGA	183
Sbjct	81	TACGGTACCACCACGCTGTGCCGAAAAGTCTGCCTGTCGTCCAGATACTCAGCATACGGA	22
Query	184	TTTCCTTCCACC	195
Sbjct	21	TTTCCTTCCACC	10

Figura 12: Exemplo de análise do éxon 6 do gene *TP53* no *Gneme Bank* comparando a região estudada após o sequenciamento (Query) e a seqüência selvagem (Sbjct).

5. DISCUSSÃO

O câncer bucal é uma doença de etiologia multifatorial e patogenia controversa. Ao procurar entender porque células da mucosa bucal são convertidas ao fenótipo maligno, várias linhas de pesquisa foram estabelecidas, a fim de buscar nos mecanismos da carcinogênese e em todas as suas particularidades, as repostas para o processo de desenvolvimento tumoral (Nishimura, 1999; Okazaki et al., 2002).

Nos últimos anos, percebeu-se que a correlação entre mecanismo de ação dos agentes cancerígenos e os eventos pelos quais desencadeiam a carcinogênese bucal representa peça chave para o entendimento de sua patogênese. Nesse sentido, os denominados modelos de carcinogênese de média-duração, proporcionam boa caracterização dos mecanismos reagentes da carcinogênese bucal em todas as fases de suas evolução em menor intervalo de tempo e, portanto, com menor custo (Ribeiro, 2005)

Sugere-se que o carcinoma espinocelular desenvolve-se por meio de dois mecanismos, no primeiro, denominado “de novo”, o carcinoma se desenvolve diretamente da mucosa normal; no segundo desenvolve-se pela “seqüência displasia – carcinoma” no qual o tecido é cancerizado via displasia epitelial (Pindborg et al, 1985), sendo esta lesão considerada como a primeira fase do processo da carcinogênese (Okazaki et al, 2002).

Desse modo, o presente estudo teve como objetivo principal investigar a expressão da proteína p53 por meio de técnica imunohistoquímica, mutações no gene *TP53*, nos exons 5 a 8, por seqüenciamento genético em modelo de carcinogênese experimental em língua de ratos, e, paralelamente, comparar e correlacionar possíveis relações com os parâmetros macroscópicos e histopatológicos encontrados.

Os momentos de sacrifício dos animais foram fixados em 4, 12 e 20 semanas após o tratamento com o carcinógeno. Estes períodos foram determinados com base em dados existentes na literatura, como sendo os períodos para estudo das lesões iniciais, pré-neoplásicas e neoplásicas, respectivamente (Nishimura, 1999; Niwa et al., 2001). Embora o tempo máximo de estudo das neoplasias malignas orais quimicamente induzida pela 4NQO, na dosagem de 50 ppm é de 24 semanas (Nishimura, 1999; Okazaki et al., 2002), adotamos, neste estudo, o período de 20 semanas como satisfatório para o desenvolvimento dos carcinomas espinocelulares

A 4NQO tem um espectro de ação em algumas regiões anatômicas da mucosa bucal, sendo mais freqüentemente as encontradas no dorso da língua e palato duro (Nauta et al., 1996; Nishimura, 1999; Ribeiro et al 2006). Assim, optamos como área o dorso da língua, devido à sua analogia mais direta com as lesões humanas correlatas, já que no Brasil, a língua é o local mais freqüente de ocorrência do câncer na mucosa bucal (INCA, 2006), sendo que,

correspondendo a aproximadamente 95% dos tumores malignos da cavidade oral (Coletta et al., 2002). Dessa forma, as lesões detectáveis do ponto de vista macroscópico ou clínico foram correlatas aos achados microscópicos. Os resultados anátomo-clínicos mostraram que a mucosa lingual dos animais do grupo controle apresentava características de normalidade, com coloração rosa-pálida e com padrão de queratinização uniforme. No grupo experimental as alterações foram observadas em alguns animais somente a partir de 12^a semana após o tratamento e caracterizadas por mancha branca e exofítica; na 20^a semana, a maioria dos casos apresentou mancha branca e exofítica e com maior gravidade. De uma forma geral, a administração crônica da 4NQO induziu lesões brancas detectáveis macroscopicamente na maioria dos animais expostos, achados estes que concordaram com os de Ohne et al. (1985) e de Niwa et al. (2001), que utilizaram o mesmo modelo experimental.

A leucoplasia oral faz parte de um grupo de lesões heterogêneas, sendo que, histologicamente, de 5% a 15% são classificadas como displasias (Suarez et al, 1998; Pindborg et al, 1997, Subdo&Reith, 2005). A displasia epitelial oral é um termo diagnóstico usado para discutir mudanças histopatológicas e é aplicado quando distúrbios da arquitetura celular são acompanhados por atipia citológica e alterações na maturação celular (Reibel, 2003). Há forte evidência de que a displasia epitelial é um provável marcador biológico de malignidade, uma vez que o risco das displasias moderadas ou severas é significativamente maior quando comparado à displasia leve ou hiperplasia (Sudbo et al., 2001, Subdo&Reith, 2005, Carici et al, 2005).

A análise histopatológica das lesões mostraram que as alterações iniciaram-se somente a partir da 12^a semana de tratamento com a 4NQO, e foram descritas como hiperplasia e hiperqueratose com ou sem displasia. Na 20^a semana o padrão de gravidade aumentou, e a maioria dos casos mostrou-se com displasia severa. Carcinomas espinocelulares microinvasivo e invasivo foram também observados nesse período. Esses carcinomas induzidos pela 4NQO eram bem diferenciados, com atipias celulares, pleomorfismo, mitoses freqüentes, disqueratose de células isoladas e pérolas córnea. Com base nesses achados, poder-se-ia afirmar que a evolução da carcinogênese bucal murina induzida pela 4NQO foi análoga a de seres humanos. Esses achados estão em concordância com a maioria dos autores que fizeram uso deste modelo em ratos (Nishimura, 1999; Niwa et al., 2001; Okazaki et al., 2002, Ribeiro et al, 2007).

A displasia epitelial oral tem interpretações subjetivas devido a diferentes observações histológicas (Kurokawa et al, 2003). Portanto, achados histopatológicos de displasia não são suficientes para prever a progressão de malignização, uma vez que a biopsia não representa toda a lesão, assim como a análise histopatológica depende da avaliação da lesão como um

todo (Van Houten et al, 2004). Assim, estudos com biomarcadores tornam-se relevantes e necessários para se avaliar com maior objetividade o comportamento tumoral (Scully & Burkhardt, 1993; Warnakulasuriya, 2000; Oliver et al, 2000).

A expressão da proteína p53 e mutação no gene *TP53* têm sido observadas na fase de displasia epitelial (Skin et al., 1994; Li et al, 1995; Shahnava et al, 2000). Assim como foi comprovada a participação do gene *TP53* nos eventos iniciais da carcinogênese (El-Naggar et al, 1995; Qin et al, 1999). A detecção da expressão da proteína p53 e mutação do gene *TP53* tem sido importante para o diagnóstico da carcinogênese oral (Okazaki et al, 2002) A proteína p53 é expressa quando ocorre agressão ao genoma, sendo, portanto, uma das responsáveis pela manutenção da integridade do DNA. Associação da p53 com o grau de displasia epitelial e sua progressão para carcinoma espinocelular já foi descrita por alguns autores (Cruz et al, 1998; Sulkowska et al, 2001; Valente et al, 2001; Okazaki et al 2002; Kurokawa et al 2003; Santos-Garcia et al 2005; Abbas et al, 2007; Brennan et al, 2007), muito embora o papel do gene *TP53* na displasia ainda não seja claro (Reibel, 2003). Pesquisas têm demonstrado expressões aberrantes do gene *TP53* em 28% das hiperplasias epiteliais benignas, 57% nas displasias médias, 55% nas moderadas e 71% nas severas (Ichikawa et al, 1997), e a incidência do gene *TP53* mutado no carcinoma espinocelular oral varia de 26% a 76% (Ichikawa et al, 1997; Chomchai, 1999; Kudo 2000; Ostwald 2000; Kozamara et al, 2005; Tsantoulis et al, 2007). A mutação do gene *TP53* produz acúmulo da proteína p53 a qual pode ser detectada por métodos moleculares (Scully&Burkhardt, 1993; Hussain&Harris, 1998; Lippman&Hong, 2001; Sidransky, 2002) e imunohistoquímicos (Nakopoulou et al, 1998; Kerdpon et al, 1997; Lopez-Martinez et al, 2002) com positividade de 57% para os tumores orais (Tsantoulis et al, 2007).

No presente estudo, a análise imunohistoquímica mostrou que a expressão da proteína p53 foi somente nuclear. No epitélio normal, representado pelo grupo controle, a expressão da p53 foi fracamente detectada e limitada à camada basal ou às células da camada suprabasal imediata. Resultados semelhantes foram observados no grupo de 4 semanas de exposição ao carcinógeno, uma vez que neste período nenhuma mudança histológica foi detectada. Entretanto, expressividade da p53 foi identificada nas células da camada suprabasal do epitélio nos grupos de 12 e 20 semanas de exposição a 4NQO, ou seja, tanto no epitélio displásico quanto no carcinoma já instalado. Resultados semelhantes foram obtidos por Levine, 1997; Ichikawa et al, 1997; Okazaki et al, 2002; Kurokawa et al, 2003).

Quando a célula é exposta à agressão genotóxica por agentes químicos, há aumento dos níveis da proteína p53, que se combina a fatores de transcrição, impedindo que a célula entre na fase S do ciclo celular. Dessa forma, a parada reversível do ciclo celular na transição G1-S

permite a reparação da lesão do DNA e o estabelecimento da integridade do genoma. Quando as alterações do DNA excedem a capacidade de reparo, é desencadeada a morte celular por apoptose. Estudos têm mostrado prevalência e localização de apoptose dentro de tecido displásico (Reibel, 2003), bem como aumento no número de células apoptóticas durante as fases de progressão da displasia epitelial (Abiko & Ohuchi, 1994; Macluskey et al, 2000), e a inibição da apoptose como causa da carcinogênese (Kohno et al, 2002; Okazaki et al, 2002). Chiang et al (2000), avaliaram a expressão da proteína p53 em hiperplasias epiteliais benignas e displasias e observaram que células apoptóticas estavam localizadas dentro da camada de queratina exclusivamente no tecido normal e hiperplásico, e com extensão para a camada basal no tecido displásico. Na displasia leve e moderada células apoptóticas eram proeminentes, mas na displasia severa e carcinoma se mostraram em baixo número (Reibel, 2003). Resultados semelhantes foram observados por Syafriadi et al (2005).

Há dados na literatura que mostram que a porcentagem de carcinoma no mesmo local da leucoplasia, levando em consideração o grau de aneuploidia variou de 24% a 100%, e que o tumor também se desenvolve em áreas equidistante da leucoplasia, em média de 3 a 4,5 cm (Pindborg et al, 1997; Barnes et al, 2005), o que sugere, que o câncer é geneticamente distinto da leucoplasia ressecada, ou resultado de uma expansão lateral clonal da leucoplasia (Abbey et al, 1995; Subdo et al, 2001).

Slaughter et al (1953), propôs a teoria do campo de cancerização ou seja, “campo de células geneticamente alteradas”. Atualmente, isso significa que células geneticamente alteradas, proliferam gradualmente e expandem em um campo não invasivo, o qual é vulnerável a danos genéticos. Este campo não é macroscopicamente detectável, mas fértil para evolução de lesões epiteliais potencialmente malignas e eventualmente câncer invasivo. Embora a lesão possa ter sido totalmente removida cirurgicamente, o campo pode persistir e o paciente pode ter risco para um segundo tumor no mesmo local (Braakhuis et al, 2003, 2004). A exata característica molecular da susceptibilidade genética deste campo alterado não é clara, mas genes supressores de tumor como *TP53*, *CDKN2A* (Tabor et al, 2002) e *pRB* podem ser a chave nos estágios iniciais (Tsantoulis et al, 2007)

A progressão maligna ocorre por graus crescentes de displasias, resultado do acúmulo de diversas alterações genéticas e moleculares (Scully et al, 2000a,c), ou seja, tumores crescem mediante processo de evolução clonal determinado por mutações (Vogelstein & Kinzler, 1993; Tsantoulis et al, 2007). Alterações em oncogenes e genes supressores de tumor têm papel importante nessa transição (Cruz et al, 1998; Murti et al, 1998; van Oijen et al, 1999; Iamaroon et al 2004).

Certamente, o estabelecimento definitivo da patogenia do câncer de boca está além de dados morfológicos quantitativos e qualitativos. Considerando que a carcinogênese é um processo de múltiplas etapas, caracterizadas por eventos genéticos, epigenéticos e alterações fenotípicas em diferentes níveis bioquímicos e moleculares, é relevante a utilização de metodologias capazes de detectar alterações globais, e que possam prever níveis de instabilidade genômica, antecipando, assim, o risco de progressão da doença (Nagpal & Das, 2003; Sudbo et al., 2003; Kulkarni & Saranath, 2004).

Mesmo havendo algum consenso a respeito das particularidades encontradas no padrão de danos no DNA durante a carcinogênese bucal, há dúvidas sobre a dinâmica e o mecanismo de carcinogenicidade. É bem estabelecido os tumores provêm da acumulação progressiva de alterações genéticas em vários genes relacionados à proliferação celular, incluindo oncogenes e genes supressores tumorais (Fearon & Vogelstein, 1990; Califano et al., 1996; Partridge, 2000). A frequência de mutações do gene *TP53* varia de acordo com o tipo de tumor (Hollstein et al. 1991; Greenblatt et al., 1994); nos tumores de cabeça e pescoço ocorrem em aproximadamente 37% dos casos (Greenblatt et al., 1994). A mutação pode ser causada por alterações genéticas tais como mutações de ponto, deleções, ou por mecanismos epigenéticos, incluindo a associação da proteína p53 com proteínas inibitórias como a MDM2 (Vogelstein&Kinzler, 1992; Momand et al., 1992). Os resultados do seqüenciamento genético do gene *TP53*, exons 5 a 8, mostraram que não houve mutação nas regiões em todos os períodos experimentais. A ausência de mutações nesse gene supressor tumoral durante a carcinogênese bucal foi um fato inesperado e difícil entendimento. Cumpre ressaltar que, muitos estudos demonstraram correlação entre a presença de mutações e acúmulo da proteína p53 (Navone et al., 1993; Iggo et al., 1990; Marks et al., 1991). Entretanto, nem sempre esta correlação está presente, haja visto que, tem sido amplamente divulgado que a mutação do gene *TP53* pode ser um dos mecanismos responsáveis pela fixação nuclear da proteína p53 (Wynford-Thomas, 1992; Navone et al., 1993; Xu et al., 1994; Wang et al., 1995; Rowley et al., 1998). Adicionalmente, vários estudos mostraram que artefato de técnica, alterações epigenéticas (Bjelogrlic et al., 1994), mutações do gene *TP53* fora das regiões de *hot spot* (Ruggeri et al., 1993; Peller et al., 1995; Gimenez-Conti et al., 1996) e insensibilidade na estratégia de seqüenciamento (Rowley et al., 1998) podem, também, explicar a falta de correlação linear entre a expressão da proteína p53 e mutação no gene *TP53* . Estudos adicionais são necessários para esclarecer os mecanismos decorrentes da progressão tumoral.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, podemos concluir que:

1. a indução da carcinogênese experimental em língua de ratos Wistar com a 4NQO é um método efetivo para o estudo da progressão do câncer oral em todas as suas fases de desenvolvimento, pois a evolução é similar àquela encontrada em seres humanos;
2. a proteína p53 foi expressa nas lesões pré neoplásicas e no carcinoma, conforme evidenciado pelos períodos experimentais de 12 e 20 semanas, respectivamente;
3. não foram evidenciadas mutações nos éxons 5 a 8 do gene TP53 em todas as fases da carcinogênese lingual;
4. a expressão anômala da proteína p53 nas fases intermediária e final da carcinogênese bucal não pode ser relacionada à presença de mutações nos exons 5-8 do respectivo gene.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas NF, El-Sharkawy SL, Abbas EA, El-Shaer MAM. Immunohistochemical study of p53 and angiogenesis in benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103:385-90

Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA, et al. intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;80:188-91

Abiko T, Ohuchi T. In situ labeling of Nuclear DNA fragmentation in normal oral epithelia and squamous cell carcinoma. *Jpn J Oral Biol.* 1994;36:67-70.

Ai H, Barrera JE, Meyers AD, Shroyer KR, Varella-Garcia M. Chromosomal aneuploidy precedes morphological changes and supports multifocality in head and neck lesions. *Laryngoscope.* 2001;111:1853-8.

Almong N, Rotter V. An insight into the life of p53: a protein coping with many functions! Review of the 9th p53 Workshop, Crete, May 9-13, 1998. [Biochim Biophys Acta.](#) 1998;1378:R43-54.

Altschul Sf, Gish W, Miller W, Myers Ew, Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215:403-10.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science.* 1989; 244: 217-21.

Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of the head and neck. Lyon: IARC Press;2005.

Barret JC. Mechanisms of multistep carcinogenesis and risk assessment. *Environ Health Perspect.* 1993;100: 9-20.

Bird RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: Preliminary findings. *Cancer Lett.* 1987;37:147-51.

Bjelogrlic NM, [Mäkinen M](#), [Stenbäck F](#), [Vähäkangas K](#). Benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-DNA adducts and increased p53 protein in mouse skin. [Carcinogenesis.](#) 1994;15:771-4.

Bouquot JE. Oral leukoplakia and eritroplakia: a review and update. *Pract Periodont Aesthet Dent.* 1994;6:9-17.

Braakhuis BJM, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenho RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck.* 2002; 24:198-206.

Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenho RH. A Genetic explanation of slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 2003; 63:1727-30.

Braakhuis BJM, Leemans CR, Brakenho RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med.* 2004;33:317-22.

Brennan M, Migliorati CA, Lockhart PB, Wray D, Al-Hashimi I, Axéll T, et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103 suppl 1:S19.e1-12.

Brown LM, Gridley G, Diehl SR, Winn DM, Harty LC, Otero EB, et al. Family cancer history and susceptibility to oral carcinoma in Puerto Rico. *Cancer.* 2001;92:2102-8.

[Bullock AN](#), [Fersht AR](#) Rescuing the function of mutant p53. [Nat Rev Cancer.](#) 2001;1:68-76.

Burkhardt A. Advanced methods in the evaluation of premalignant lesions and carcinomas of the oral mucosa. *J Oral Pathol.* 1985;14:751-78.

Califano J, Van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clyman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996;56:2488-92.

[Canman CE](#), [Gilmer TM](#), [Coutts SB](#), [Kastan MB](#). Growth factor modulation of p53-mediated growth arrest versus apoptosis. [Genes Dev.](#) 1995;9:600-11.

Canzian F, Ushijima T, Toyota M, Sugimiura T, Nagao M. Linkage mapping of the rat T p53 gene on Chromosome 10. *Mamm. Genome.* 1996; 7:630.

Carinci F, Lo Muzio L, Piattelli A, Rubini C, Palmieri A, Stabellini G, et al. Genetic portrait of mild and severe lingual dysplasia. *Oral Oncol.* 2005; 41:365-374.

Chen YK, Hsue SS, Lin LM. Immunohistochemical demonstration of p63 in DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis. *Oral Dis.* 2003; 9:235-40.

Chhabra RS, Huff JE, Schwetz BS, Selkirk J. An overview of prechronic and chronic toxicity / carcinogenicity experimental study designs and criteria used by the National Toxicology Program. *Environ Health Perspect.* 1990; 86:313-43.

Chiang CP, Lang MJ, Liu BY, Wang JT, Leu JS, Hahn LJ, et al. Expression of p53 protein in oral submucous fibrosis, oral epithelial hyperkeratosis, and oral epithelial dysplasia. *J Formos Med Assoc.* 2000;99:229-34.

Chomchai JS, Du W, Sarkar FH. Prognostic significance of p53 gene mutation in laryngeal cancer. *Laryngoscope.* 1999;109:455-9.

Colleta RD, Graner E, Lopes MA, Vargas PA, Jorge Jr J, de Almeida OP. Avanços da biologia molecular e o cancer bucal. Rev Paul Cir Dent. 2002;56:62-7.

Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal, et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1995;121:157-60.

Cotran RS, Kumar V, Collins TR. Robbins pathologic basis of diseases. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 1999. p.290-2.

Cruz IB, Snijders PJ, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. J Pathol. 1998;184:360-8.

Dayan D, Hirshberg A, Kaplan I, Rotem N, Bodner L. Experimental tongue cancer in desalivated rats. Oral Oncol. 1997; 33:105-9.

De Camargo JLV, De Oliveira MLC, Rocha NS, Ito N. A detecção de substâncias cancerígenas em estudos experimentais. Rev Bras Cancerol. 1994;44:21-30.

Dietrich T, Reichart PA, Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. Oral Oncol. 2004;40:158-63.

El-Naggar AK, Lasi S, Luna MA, Zhou XD, Weber RS, Goepfert H, et al. Sequential p53 mutations análise of pre-invasive and invasive head and neck squamous carcinoma. Int J Cancer. 1995;64:196-201.

Fassoni AA, Salles CLF, Consolaro A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: Estudo em hamsters sírios dourados. Rev Odontol USP. 1993;7:285-91.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990;61:759-67.

Fischer DJ, Epstein JB, Morton Jr, TH, Schwart SM. Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral pre-malignant and malignant lesions. J Oral Pathol Med. 2004;33:65-70.

Foukes WD, Narod SA. Screening for cancer in hig risk families. Cancer Treat Res. 1996;86:165-82.

Fronza G, Campomenosi P, Abbondandolo A. The 4-nitroquinoline 1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. Nucleic Acids Res. 1992;20:1283-7.

Gart JJ, Krewski D, LeePN, Tarone RE, Wanrendorf J. Statistical methods in cancer research. Volume III. The design and analysis of long-term animal experiments. Lyon: IARC; 1896. IARC Scientific Publications,.79.

[Gimenez-Conti IB](#), [LaBate M](#), [Liu F](#), [Osterndorff E](#). p53 alterations in chemically induced hamster cheek-pouch lesions. [Mol Carcinog](#). 1996;16:197-202.

Goldstein AM, Blot WJ, Greenberg RS, Schoenberg JB, Austin DF, Preston-Martin S, et al. Familial risk in oral and pharyngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994;30B:319-22.

Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A, Martinez-Lara I. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head Neck*. 2000;22:658-61.

Greenblatt MS, [Bennett WP](#), [Hollstein M](#), [Harris CC](#). Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. [Cancer Res](#). 1994;54:4855-78.

Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin*. 2000;50:77-33.

Hahn M, Hagedorn G, Kuhlisch E, Schackert HK, Edkelt U. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cavity cancer. *Oral Oncol*. 2002;38: 486-90.

Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. [N Engl J Med](#). 1993;329:1318-27.

[Hernandez-Boussard T](#), [Rodriguez-Tome P](#), [Montesano R](#), [Hainaut P](#). IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines. International Agency for Research on Câncer. [Hum Mutat](#). 1999;14:1-8.

Hogewind WF, van der Waal I, van der Kwast WA, Snow GB. The association of white lesions with oral squamous cell carcinoma. A restrospective study of 212 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1989;18:163-4.

Hollstein M, Sidransky D, Volgestein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991; 253:49-53.

Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res*. 1998;58:4023-37.

Iamaroon A, Khemaleelakul U, Pongsiriwet S, Pintong J. Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2004;33:30-6.

Ichikawa M, Ishii K, Nakajima T, Mogi K. The overexpression of p53 and proliferative activity in precancerous and cancerous lesions of oral squamous epithelium. *J Exp Clin Cancer Res*. 1997;16:141-6.

[Iggo R](#), [Gatter K](#), [Bartek J](#), [Lane D](#), [Harris AL](#). Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung câncer. [Lancet](#). 1990;335:675-9.

INCA [homepage on the internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2007. [acesso 14 dez 2007]. Disponível em: www.inca.gov.br.

[Isobe M](#), [Emanuel BS](#), [Givol D](#), [Oren M](#), [Croce CM](#). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. [Nature](#). 1986;320:84-5.

Ito N, Shirai T, Fukushima S. Medium-term bioassay for carcinogens using multiorgan models. *Prog Exp Tumor Res*. 1991;33:41-57.

Jacobs C, Goffinet DR, Goffinet L, Kohler M, Fu WE. Chemotherapy as a substitute for surgery in the treatment advanced respectable head and neck cancer. A report from the Northern California Group. *Cancer*. 1987;60:1178-83.

Jiang WW, Fujii H, Shirai T, Mega H, Takagi M. Accumulative increase of loss of heterozygosity from leukoplakia to foci of early cancerization in leukoplakia of the oral cavity. *Cancer*. 2001;92:2349-56.

Karabulut A, Reibel J, Therkildsen MH, Praetorius F, Nielsen HW, Dabelsteen E. Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. *J Oral Pathol Med*. 1995;24:198-200.

Keegan PE, Lunec J, Neal DE. p53 and p53-regulated genes in bladder cancer. *Br J Urol*. 1998; 82:710-20.

Keller AZ. Cirrhosis of the liver, alcoholism and heavy smoking associated with cancer of the mouth and pharynx. *Cancer*. 1967; 20:1015-22.

Kerdpon D, Rich AM, Reade PC. Expression of p53 in oral mucosa hyperplasia, dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 1997;3:86-92.

Kohno Y, Patel V, Kim Y, et al. Apoptosis, proliferation and p21^{doc-1} profiles in normal dysplastic and malignant squamous epithelium of the Syrian hamster cheek pouch model. *Oral Oncol*. 2002;38:274-80.

Kovesi G, Szende B. Progression of leukoplakia is associated with changes in apoptotic and mitotic index as well as in p53 and Ki-67 expression. *Oncology*. 2002;46:333-8.

Kozamara R, Jovic N, Magic Z, Brankovic-Magic M, Minic V. p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *J Cranio Maxillo Surg*. 2005;33:342-8.

Kudo Y, Takata T, Ogawa I, Zhao M, Sato S, Takekoshi T, et al. Reduced expression of p27 (kip1) correlates with an early stage of cancer invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2000;151:217-22.

Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol*. 2006;42:987-93.

Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinoma and adjacent normal tissues. *Oral Oncol.* 2004;40:145-53.

Kurokawa H, Yamashida Y, Takeda S, Tomoyose T, Funaki K, Takano H, et al. Relationship between epithelial dysplasia and the development of squamous cell carcinoma in oral leukoplakia. *Asian J Oral Maxillofac Surg.* 2002;14:197-201.

Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, Yamashita Y, Tomoyose T, Zhang M, et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2003;32:513-21.

[Lavieille JP](#), [Righini C](#), [Reyt E](#), [Brambilla C](#), Riva C. Implications of p53 alterations and anti-p53 antibody response in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 1998;34:84-92.

Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Mao L, Lotan R, Shin SM, et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: 10 years of translational research. *Clin Cancer Res.* 2000;6:1702-10.

Levine, AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumor suppressor gene. *Nature.* 1991;351:453-6.

Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997;88:323-31.

Li YQ, Pavelic ZP, Wang LJ, McDonald JS, Gleich L, Munck-Wikland E, et al. Altered p53 in microdissected, metachronous, pre-malignant oral lesions from the same patients. *Clin Mol Pathol.* 1995;48:M269-72.

Li N, Han C, Chen J. Tea preparations protect against DMBA-induced oral carcinogenesis in hamsters. *Nutr Cancer.* 1999;35: 73-9.

Lind PO. Malignant transformation in oral leukoplakia. *Scand J Dent Res.* 1987;95:449-55.

Lippman SM, Peters EJ, Wargovich MJ, Stadnyk AN, Dixon DO, Dekmezian RH, et al. Bronchial micronuclei as a marker of an early stage of carcinogenesis in the human tracheobronchial epithelium. *Int J Cancer.* 1990; 45:811-5.

Lippman SM, Hong WK. Molecular markers of the risk of oral cancer. *N Engl J Med.* 2001;344:1323-6.

Lissowska J, Pilarska A, Pilarski P, Samolczyk-Wanyura D, Piekarczyk L, Bardin-Mikollajczak A, et al. Smoking, alcohol, diet, dentition and sexual practices in the epidemiology of oral cancer in Poland. *Eur J Cancer Prev.* 2003;12:25-33.

Livingstone LR, White A. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell.* 1992;70:923-35.

Lopez-Martinez M, Anzola M, Cuevas N, Aguirre JM, Martinez de Pancorbo M. Aplicaciones clinicas del diagnóstico de las alteraciones de p53 en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (p53 en el CECC). *Med Oral*. 2002;7:108-20.

Macluskey M, Chandrachud LM, Pazaouki S, Green M, Chishalm DM, Ogden GR, et al. Apoptosis, proliferation, and angiogenesis in oral tissue. Possible relevance to tumor progression. *J Pathol*. 2000;191:368-75.

Maraki D, Becker J, Boecking A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med*. 2004;33:398-404.

[Marks JR](#), [Davidoff AM](#), [Kerns BJ](#), [Humphrey PA](#), [Pence JC](#), [Dodge RK](#), [Clarke-Pearson DL](#), [Iglehart JD](#), [Bast RC Jr](#), [Berchuck A](#). Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. [Cancer Res](#). 1991;51:2979-84.

Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:774-81.

Mashberg A, Boffetta P, Winkelman R, Garfinkel L. Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. *Cancer*. 1993;72: 1369-75.

Mashberg A. Diagnosis of early oral and oropharyngeal squamous carcinoma: obstacles and their amelioration. *Oral Oncol*. 2000;36:253-5.

May PM, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999;18:7621-36.

McIntyre GT, Oliver RJ. Update on precancerous lesions. *Dent Update*. 1999; 26:382-6.

Melrose RJ. Premalignant oral mucosa diseases. *J Calif Dent Assoc*. 2001;29:593-600.

[Momand J](#), [Zambetti GP](#), [Olson DC](#), [George D](#), Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. [Cell](#). 1992;69:1237-45.

Montesano R, Bartsh H, Vainio H, Wilbourn J, Yamasaki H. Long-term and short-term assays for carcinogens. A critical appraisal. International Agency for Research on Cancer. Lyon: 1986. IARC Scientific Publications, 83.

Morgan SE, Kastan MB. p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. [Adv Cancer Res](#). 1997;71:1-25.

Mork J. Forty years of monitoring head and neck cancer in Norway-no good news. *Anticancer Res*. 1998;18:3705-08.

Murti PR, Warnakulasuriya KA, Johnson NW, Bhonsle RB, Grupta PC, Daftary DK, et al. p53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential. *J Oral Pathol Med.* 1998;27:191-6.

Nagpal JK, Patinaik S, Das BR. Prevalence of high risk Human Papilloma Virus Types and its association with p53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. *Int J Cancer.* 2002;97:649-53.

Nagpal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol.* 2003;39:213-21.

Nakopoulou L, Vourlakou C, Zervas A, Tzonou A, Gakiopoulou H, Dermopoulous MA. The prevalence of bcl-2, p53, and Ki-67 immunoreactivity in transitional cell bladder carcinomas and their clinicopathologic correlates. *Hum Pathol.* 1998;29:146-54.

Nauta JM, Roodenburg JL, Nikkels PG, Witjes MJ, Vermey A. Epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the Wistar rat palatal mucosa: 4NQO model. *Head Neck.* 1996;18:441-9.

[Navone NM](#), [Troncoso P](#), [Pisters LL](#), [Goodrow TL](#), [Palmer JL](#), [Nichols WW](#), [von Eschenbach AC](#), [Conti CJ](#). p53 protein accumulation and gene mutation in the progression of human prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1993;85:1657-69.

Neville BW, Allen CM, Damm DD. *Oral and Maxillofacial Pathology.* 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1995.p. 282-8.

Nigro, J M, [Baker SJ](#), [Preisinger AC](#), [Jessup JM](#), [Hostetter R](#), [Cleary K](#), et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature.* 1989;342:705-8.

Nishimura A. Changes in Bcl-2 and Bax expression in rat tongue during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis. *J Dent Res.* 1999;78:1264-9.

Niwa S, Ueno S, Shirasu R. Alteration of pRB expression in the development of rat tongue carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Oral Oncol.* 2001;37:579-85.

Nowell C. Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 1994;46:2203-7.

Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med.* 2000;29:413-25.

Ogden GR, Macluskey M. An overview of the prevention of oral cancer and diagnostic markers of malignant change: 1. Prevention. *Dent Update.* 2000; 27:95-9.

Ohne M, Satoh T, Yamada S, Takai H. Experimental tongue carcinoma of rats induced by oral administration of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) in drinking water. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1985;59:600-7.

Okazaki Y, Tanaka Y, Tonogi M, Yamane G. Investigation of environmental factors for diagnosing malignant potential in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.* 2002;38:562-73.

Oliver RJ, McDonald DG, Felix DH. Aspects of cell proliferation in oral epithelial dysplastic lesions. *J Oral Pathol Med.* 2000;29:49-55.

Oliver RJ, MacDonald DG. G1 cyclins in oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2001;30:80-6.

Oren M. p53: the ultimate tumor suppressor gene?. *Faseb J.* 1992; 6:169-76.

Ostwald C, Gogaez P, Hillmann T, Schweder J, Gundlach K, Kundt G, et al. p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. *Int J Cancer.* 2000;88:82-6.

Osugi T. p53 expression in various stages of 4-nitroquinoline 1-oxide induced carcinoma in the rat tongue. *J Osaka Dent Univ.* 1996;30:29-35.

Partridge M. Oral cancer: 1. The genetic basis of the disease. *Dent Updte.* 2000;27:242-8.

Peller S, Halevy A, Slutzki S, Kopilova Y, Rotter V. p53 mutations in matched primary and metastatic human tumors. *Mol Carcinog.* 1995;13:166-72.

Perera F, Boffeta P. Perspectives on comparing risk of environmental carcinogens. *J Natl Cancer Inst.* 1988;80:1282-93.

Pindborg JJ, Reibel J, Holmstrup P. Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. *J Oral Pathol.* 1985;14:698-708.

Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. *Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa.* 2nd ed. London: Springer Verlag; 1997.

Pitot HC, Dragan Y. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *Faseb J.* 1991;5: 2280-6.

Pitot HC. Progression: the terminal stage in carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res.* 1989;80:599-607.

Pitot HC. The molecular biology of carcinogenesis. *Câncer.* 1993;72:962-70.

- Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*. 1998;95:5-8.
- Prokocimer, M; Rotter, V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. [Blood](#). 1994;84:2391-411.
- Puerto S, Marcos R, Ramirez MJ, Creusa A, Boei JJ, Meijers M, et al. Induction, processing persistence of radiation-induced chromosomal aberrations involving hamster euchromatin and heterochromatin. *Mutat. Res*. 2000;469:169-79.
- Qin GZ, Park JY, Chen SY, Lazarus P. A high prevalence of p53 mutations in pre-malignant oral erythroplakia. *Int J Cancer*. 1999;80:345-8.
- Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14:47-62.
- Ribeiro DA, Salvadori DMF, Silva RN, Darros BR, Marques MEA. Genomic instability in non-neoplastic oral mucosa cells can predict risk during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2004a; 40: 910-5.
- Ribeiro DA, Silva RN, Darros BR, Salvadori DMF, Marques MEA. Changes in minor salivary glands during 4-nitroquinoline 1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis. *Rev Med Parana*. 2004b; 62:33.
- Ribeiro DA. Evolução do carcinoma espinocelular na mucosa bucal induzido pela 4NQO (4-nitroquinolina 1-óxido) em ratos wistar [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual; 2005.
- Ribeiro DA, Kitakawa D, Domingues MPC, Cabral LAG, Marques MEA, Salvadori DMF. Survivin and inducible nitric oxide synthase production during 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis: A possible relationship. *Exp Mol Pathol*. 2007;83:131-7.
- Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt E-B, Bladström A, Hansson BG, Andersson G. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol*. 2005;125:1327-36.
- Rotter V, Prokocimer M. p53 and human malignancies. [Adv Cancer Res](#). 1991;57:257-72.
- [Rowley H](#), [Sherrington P](#), [Helliwell TR](#), [Kinsella A](#), [Jones AS](#). p53 expression and p53 gene mutation in oral cancer and dysplasia. [Otolaryngol Head Neck Surg](#). 1998;118:115-23.
- [Ruggeri B](#), [DiRado M](#), [Zhang SY](#), [Bauer B](#), [Goodrow T](#), [Klein-Szanto AJ](#). Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumors exhibit frequent and characteristic G to T mutations in the p53 gene. [Proc Natl Acad Sci U S A](#). 1993;90:1013-7.
- Saito T, Mizuno S, Notani K, Fukuda H, Kobayashi I, Shindoh M, et al. Flow cytometric analysis of cell cycle fractions in oral leukoplakia: relation to clinicopathologic findings. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998;27:217-21.
- Saito T, Yamashita T, Notani K, Fukuda H, Mizuno S, Shindoh M, et al. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in oral leukoplakia: relation to clinicopathologic findings. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1995;24:44-7.

Saito T, Sugiura C, Hirai A, Notanik K, Totsuka Y, Shinodoh M, et al. Development of squamous cell carcinoma from pre-existent oral leukoplakia: respect to treatment modality. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001;30:49-53.

Salley JJ. Histologic changes in the hamster cheek pouch during early hydrocarbon carcinogenesis. *J Dent Res.* 1957;36:48-55.

Sankaranarayanan R, Mathew B, Varghese C, Sudhakaran PR, Menon V, Jayadeep A, et al. Chemoprevention of oral leukoplakia with vitamin A and beta carotene: an assessment. *Oral Oncol.* 1997;33:231-6.

Santos-García A, Hernández MMA, Sánchez EF, Hernández JJC, Sopelana AB. Expresión protéica de p53 y proliferación celular en leucoplasias orales *Med Oral Pathol Oral Cir Bucal.* 2005;10:1-8.

Saranath D. Integrated biology and molecular pathology of oral câncer. In: Saranath D, editor. *Contemporary Issue in Oral Cancer.* New Delhi: Oxford University Press. 2000.p.30-71.

Schwartz J, Baker V, Larios E, Desai D, Amin S. Inhibition of experimental tobacco carcinogen induced head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2004;40: 611-23.

Scully C, Burkhardt A. Tissue markers of potentially malignant human oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med.* 1993;22:246-56.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): Part 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000a; 36:256-63.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): Part 2. Chromosomal aberrations. *Oral Oncol.* 2000b; 36: 311-27.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): Part 3. Clinico-pathological applications. *Oral Oncol.* 2000c;36:404-13.

Shafer WG, Waldron CA. Eritroplakia of the oral cavity. *Cancer.* 1975;36:1021-8.

Shah JP, Johnson NW, Batsakis, JG. *Oral cancer.* London: Taylor&Francis; 2003.

Shahnavaz SA, Regezi JA, Bradley G, Dube ID, Jordan RC. p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma [see comments]. *J Pathol.* 2000;190:417-22.

Shaw PH. The role of p53 in Cell Cycle Regulation. *Pathol Res Pract.* 1996;192:669-75.

Shepman KP, van der Waal I. A proposal for classification and staging system for oral leukoplakia: a preliminary study. *Oral Oncol.* 1995;31B: 396-8.

[Shin DM](#), [Kim J](#), [Ro JY](#), [Hittelman J](#), [Roth JA](#), [Hong WK](#), [Hittelman WN](#). Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. [Cancer Res.](#) 1994;54:321-6.

Shiu MN, Chen TH. Impact of betel quid, tobacco and alcohol on three- stage disease natural history of oral leukoplakia and cancer: implication for prevention of oral cancer. *Eur J Cancer Prev.* 2004;13:39-45.

Shiu MN, Chen THH. Intervention efficacy and malignant transformation to oral cancer among patients with leukoplakia (review). *Oncol Rep.* 2003;10:1683-92.

Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:210-9.

Silverman S, Gorsky M, Lozada F. Oral leucoplakia and malignant transformation: a follow up study. *Cancer.* 1984;33:363-8.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953;6:963-8.

Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. [Ann N Y Acad Sci.](#) 2000;910:121-37.

Speight PM, Farthing PM, Bouquot JE. The pathology of oral cancer and pre-cancer. *Curr Diag Pathol.* 1996;3:165-76.

Suarez P, Batsakis JG, el-Naggar AK. Leucoplakia: still a gallimaufry or is progress being made? – A review. *Adv Anat Pathol.* 1998;5:137-55.

Subdo J, Kilsal W, Risberg B, Koppang HS, Danielsen HE, Reith A. DNA content as a prognostic marker in patients with oral leukoplakia. *N Engl J Med.* 2001a;334:1270-8

Subdo J, Bryne M, Johannessen AC, Kildal W, Danielsen HE, Reith A. Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia. *J Pathol.* 2001b;194:303-10.

Subdo J, Kildal W, Johannessen AC, Koppang HS, Subdo A, Danielsen HE, et al. Gross genomic aberrations in pre-cancers: clinical implications of a long-term follow-up study in oral erythroplakias. *J Clin Oncol.* 2002;20:456-62.

Subdo J, Bryne M, Mao L, Lotan R, Reith A, Kildal W, et al. Molecular based treatment of oral cancer. *Oral Oncol.* 2003;39:749-58.

Subdo J, Lippman S, Lee JJ, Mão BL, Kildal W, Subdo A, et al. The influence of resection and aneuploidy on mortality in oral leucoplakia. *N Engl J Med.* 2004;350:1405-13.

Subdo J, Reith A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. *Int J Cancer.* 2005;115:339-45.

Sulkowska M, Famulski L, Chyczewski S, Sulkowski S. Evaluation of p53 and bcl-2 oncoprotein expression in precancerous lesions of the oral cavity. *Neoplasma*. 2001;48:94-8.

Swale VJ, Quinn AG. Tumor suppressor genes. *Clin Exp Dermatol*. 2000;25:231-5.

Syafriadi M, Cheng J, Jen KY, Ida-Yonemochi H, Suzuki M, Saku T. Two-phase appearance of oral epithelial dysplasia resulting from focal proliferation of parabasal cells and apoptosis of prickle cells. *J Oral Pathol Med*. 2005;34:140-9.

Tabor MP, Brakenho RH, Ruijter-Schippers HJ, Wal JEVD, Snow GB, Leemans CR, et al. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol*. 2002;161:1051-60.

Taghavi N, Yazdi I. Type of food and risk of oral cancer. *Arch Iran Med*. 2007;10:227-32.

Thuler LCS, Rebelo MS. Epidemiologia do câncer. In: Kowalsky LP, Dib LL, Ikeda MK, Adde C. *Prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer bucal*. São Paulo: Ed. Frôntis; 1999. p.1-9.

Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol*. 2007;43:523-34.

Valente G, Pagano M, Carrozzo M, Carbone M, Bobba V, Palestro G, et al. Sequential immunohistochemical p53 expression in biopsies of oral lichen planus undergoing malignant evolution. *J Oral Pathol Med*. 2001;30:135-40.

Van Houten V, Leemans CR, Kummer JA, Dijkstra J, Kuik DJ, van den Brekel MW, et al. Molecular diagnosis of surgical margins and local recurrence in head and neck cancer patients: a prospective study. *Clin Cancer Res*. 2004;10:3614-20.

van Oijen MG, van de Craats JG, Slootweg PJ. p53 overexpression in oral mucosa in relation to smoking. *J Pathol*. 1999;187:469-74.

Vera-Sempere FJ, Navarro-Hervas M. Sobreexpresión del gen supresor p53 en el cáncer oral. *Med Oral*. 1997;2:283-96.

Vered M, Daniel N, Hirshberg A, Dayan D. Histomorphologic and morphometric changes in minor salivary glands of the rat tongue during 4 – nitroquinoline- - oxide – induced carcinogenesis. *Oral Oncol*. 2003;39:491-6.

Volgelstein B. A deadly inheritance. *Nature*. 1990;348:681-2.

Volgelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell*. 1992;70:523-6.

Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*. 1993;9:138-41.

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med*. 1993;328:184-94.

Waldron CA, Shafer WG. Leukoplasia revisited. A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. *Cancer*. 1975;36:1386-92.

[Wang JL](#), [Zhang ZJ](#), [Hartman M](#), [Smits A](#), [Westermarck B](#), [Muhr C](#), [Nistér M](#). Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embedded samples. *Int J Cancer*. 1995;64:223-8.

Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral cancer. *J Pathol*. 2000;190:407-9.

Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol*. 2001;194:294-7.

WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978;46:518-39.

Whyte DA, Broton CE, Shillitoe EJ. The unexplained survival of cells in oral cancer: what is role of p53? *J Oral Pathol Med*. 2002;31:125-33.

Wynford-Thomas D. p53 in tumor pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol*. 1992;166:329-30.

Xie X, Clausen OP, De Angelis P, Boysen M. The prognostic value of spontaneous apoptosis, Bax, Bcl-2, and p53 in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Cancer*. 1999;86:913-20.

Xu L, [Chen YT](#), [Huvos AG](#), [Zlotolow IM](#), [Rettig WJ](#), [Old LJ](#), [Garin-Chesa P](#) Overexpression of p53 protein in squamous cell carcinomas of head and neck without apparent gene mutations. *Diagn Mol Pathol*. 1994;3:83-92.

Zhang L, Rosin MP. Loss of heterozygosity: a potential tool in management of oral premalignant lesions? *Pathol Med*. 2001;30:513-20.

Zhu J, Zhou W, Jiang J, Chen X. Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for mediating apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273:13030-6.

8. ANEXOS



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 8802-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 28/04/99



CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Protocolo n.º 470, sobre o projeto de pesquisa intitulado "Marcadores moleculares da carcinogênese bucal: estudo comparativo em dois sítios anatômicos, a ser conduzido pelo Dr. Daniel Araki Ribeiro, sob supervisão da Prof.ª Dr.ª Daisy Maria Fávero Salvadori e colaboração da Prof.ª Dr.ª Mariângela Esther Alencar Marques, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CIBEA), com a ressalva de que os ratos são provenientes de Biotério convencional sem condições de emitir Atestado de Sanidade.

Projeto de Pesquisa Aprovado em 08/06/2005


Prof.ª Dr.ª Norma Suelli P. Mowolo
Presidente da CEEA


Alberto Santos Capelluppi
Secretário da CEEA



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99



Comissão de Ética em Experimentação Animal

Botucatu, 30 de agosto de 2.007

OF. Nº 25/2007CEEA

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Jair Cortez Montovani
Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu.

Prezado Dr. Jair,

Informo que em reunião da CEEA de 30/08/2007, foi autorizada a alteração de autoria, bem como de orientação do Projeto de Pesquisa "**Marcadores moleculares da carcinogênese bucal: estudo comparativo em dois sítios anatômicos**", na seguinte conformidade:

Autor Anterior: Drº Daniel Araki Ribeiro – **Orientador Anterior:** Profº. Drº Daisy Maria Fávero Salvadori .

Autor Atual: Drº Eliana Maria Minicucci - **Orientador Atual:** Prof. Dr. Jair Cortez Montovani.

Atenciosamente,

Profº Drº Regina Helena Garcia Martins
Presidente da CEEA.