

DETECÇÃO DA p53 EM LESÕES BENIGNAS E MALIGNAS DA MUCOSA BUCAL: CORRELAÇÃO COM O HÁBITO DE FUMAR

p53 DETECTION IN LESIONS BENIGN AND CARCINOMAS OF THE MUCOUS BUCCAL: CORRELATIONS TOBACCO SMOKING

Renato Luiz Maia NOGUEIRA*

Glauber Meira LIMA **

Silvia Helena B. RABENHORST***

Fco. Valdeci de Almeida FERREIRA****

Recebido em 09/03/2004

Aprovado em 26/03/2004

RESUMO

As neoplasias de mucosa bucal possuem alta prevalência no Brasil. A sua correlação com fatores ambientais e individuais, como o tabaco, idade e o sexo estão bem estabelecidas. O gene supressor tumoral p53 é o mais frequentemente mutado nas neoplasias humanas. Nos cânceres de boca, a mutação do p53 tem sido descrita em porcentagens que variam de 35% a 70%. Com o objetivo de caracterizar os cânceres de boca do Estado do Ceará, estudou-se, por imunohistoquímica, a detecção da p53 em pacientes (n=85) com lesões de mucosa bucal, divididas em três grupos, o 1º de referência (n=15), o 2º de lesões epiteliais proliferativas benignas (n=36) e o 3º de carcinomas invasivos (n=34). Correlacionaram-se esses achados com o tabagismo, idade, sexo e a localização da lesão. Do total dos casos, 32,9% foram p53 positivos. Nos grupos: 6,7% no 1º; 22,2% no 2º e 55,8% no 3º, foram positivos, (P=0,001). Não foi estatisticamente significativa a correlação entre a positividade para p53 e o sexo, a idade nem a localização das lesões. Os resultados foram altamente significativos (P=0,0001) entre a p53 e o tabagismo. Conclui-se que a positividade para a proteína p53, detectada por imunohistoquímica, está vinculada à malignidade com associação a pacientes expostos ao tabaco.

Descritores: p53, Câncer Bucal, Imunohistoquímica, Mucosa Bucal, Lesões Orais.

ABSTRACT

Oral cancer has a high occurrence in Brazil. The relationship of the environment and individual factors like tobacco, age and gender has been well established. The TP53 is the most frequently found gene mutated in human neoplasias. In oral cancer p53 mutation has been described in about 35 to 70 percent. With the intention of characterizing oral cancer in our region we study the presence of p53 mutation by immunohistochemistry, in 85 patients divided in three groups: 1- the control group (n = 15), 2- compound by benign lesions (n = 36) 3- compound by invading cancers (n = 35). We also correlated the p53 expression with the tobacco smoking, gender and the location of the lesions. Thirty two point nine percent of the total cases were positive, and were distributed in the following way: 6.7% in the first group, 22,2% in the second and 55.8% in the third (P = 0,001). We didn't find significant correlation among gender, age and location. The results were significant (P = 0,0001) between the expression of p53 in CECs and tobacco smoking. However, the detection of the protein p53 in benign lesions are probably the result of the normal activity to repair the injury caused by tobacco exposure.

Descriptors: p53, Buccal Cancer, Immunohistochemistry, Mucous Buccal, oral lesions.

* Mestre em Patologia e Prof. Assistente de Patologia Bucal/Estomatologia – UFC.

** Mestre em Patologia e Prof. Substituto de Patologia Bucal - UFC.

*** Doutora em Genética e Profª. Adjunta de Genética Médica da Fac. de Medicina da UFC.

**** Doutor em Patologia Humana e Prof. Adjunto de Patologia Geral da Fac. de Medicina da UFC.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o câncer constitui um problema crescente em todos os países. No Brasil, dados estatísticos indicam um aumento progressivo de sua incidência. Dentre as neoplasias presentes na cavidade bucal, o carcinoma de células escamosas é o de maior frequência. Em muitos casos, pode levar o paciente a óbito, caso seu diagnóstico não seja precocemente estabelecido. O câncer de boca é o décimo, dentre os de maior prevalência, com estimativa para 2003 em cerca de 10.635 casos, sendo 1230 destes, na região Nordeste. Estes números são suficientes, para se perceber a gravidade do problema (BRASIL, 2003).

O tabaco encontra-se entre os principais fatores cancerígenos com os quais o homem mantém contato. É um agente cancerígeno completo, atuando nas três fases da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão tumoral (FRANCO et al., 1989; KOWALSKI et al., 1991; LI et al., 1996). Contêm na sua composição mais de 4.700 substâncias, tendo 60 delas ação carcinogênica. Em adição à ação carcinogênica química, o cigarro fumado possui, ainda, uma ação mecânica pelo atrito com a mucosa e, principalmente, uma agressão térmica devido às altas temperaturas da fumaça aspirada através da boca e das vias aéreas. Essas três formas de agressão se potencializam em suas capacidades de provocar danos ao DNA dos queratinócitos do epitélio (FRANCO et al., 1989; WANDEMBERG; JONSSON ; HIRSCH et al., 1996).

No Brasil, um importante marco foi estabelecido com o trabalho de Franco et al. (1989), no qual os autores estabeleceram percentuais de risco para o desenvolvimento de câncer bucal em relação a diversos hábitos, dentre os quais o tabaco foi o principal. Neste trabalho estimou-se o risco de desenvolver câncer bucal para fumantes de cigarro industrializado, cachimbo e cigarro de fabricação manual, em 6,3; 13,9 e 7,0 vezes, respectivamente, maiores do que em não fumantes. O trabalho de

Lopes et al. (1992), realizado em 363 municípios do Brasil, estimou uma população de cerca de 30.641.554 fumantes (59% de homens e 41% de mulheres) que representa 32% da população brasileira acima de 15 anos. Esse percentual é maior na zona rural que na zona urbana, e, dentre os jovens é maior entre as mulheres do que nos homens, justificando o aumento crescente de câncer de boca entre as mulheres.

Na gênese do câncer bucal, como em outras neoplasias, atuam os fatores individuais (genéticos) e os ambientais (TOMASSI; GARRAFA, 1980; FRANCO et al., 1989). Entre os mecanismos envolvidos nas alterações genéticas que levam ao câncer, duas categorias de moléculas estão envolvidas: os oncogenes e os genes supressores tumorais (CABALLERO; DANI; SIMPSON, 1998).

Um dos mais importantes supressores tumorais é o gene p53. O gene foi descrito em 1979 e localiza-se no braço curto do cromossomo 17 na região 13.3 e compreende 11 exons. Codifica uma fosfoproteína nuclear nomeada por seu peso molecular de 53 kDa, que atua como fator de transcrição, existindo na sua forma ativa, como um tetrâmero (ARROWSMITH; MORIN, 1996; CHO et al., 1994). Os níveis de p53 são baixos nas células normais, mas se elevam rapidamente, depois da exposição a agentes que danificam o DNA, resultando na ativação transcricional de genes dependentes, como GADD45, MDM2 e p21^{WAF-1/CIP-1/SDI}. Este último é o maior alvo transcricional da proteína p53 e inibe a fosforilação mediada pelos complexos ciclina/CDK 4 e 6, incluindo o produto gênico Rb também envolvido no check-point G1. A função da proteína p53 na parada do ciclo celular era considerada como sua maior contribuição para a supressão tumoral, mas a função apoptótica demonstra ser mais importante para esta função. O envolvimento do gene p53 com uma participação crucial em algumas formas de apoptose tem sido demonstrado por alguns autores (BALINT; VOUSDEN, 2001). Assim, dentro do intrincado modelo de

regulação, a proteína p53 ocupa um ponto chave no desencadeamento desses processos, exercendo sua função diretamente, através da ativação transcricional de alguns genes e indiretamente através da interação de seus produtos protéicos com outras proteínas.

Mutações somáticas do gene p53 têm sido encontradas nas diferentes formas dos tumores e é o gene mais freqüentemente encontrado mutado nos tumores humanos. A perda de função da p53 pode ocorrer de várias maneiras: através de deleções, mutações e associação com outras proteínas (VOGELSTEIN; KINZLER, 1992; CROOK et al., 1994; VELCULESCU; EL-DEIRY, 1996). Devido à alta freqüência das lesões bucais no Estado do Ceará, foi realizado este estudo, objetivando verificar a ocorrência de expressão da proteína p53, em lesões proliferativas benignas e carcinomas da mucosa bucal e correlacionar os achados da expressão de p53 com o tabagismo, com o sexo a idade e com a localização da lesão.

MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra¹ foi constituída de 85 biópsias de mucosa bucal (lábio, língua, assoalho e palato mole e duro), rotineiramente processada, colhidas de pacientes que freqüentam por livre escolha o serviço odontológico do Instituto de Prevenção do Câncer do Ceará (IPCC)-SUS, Fortaleza -CE, no período de 11/1996 a 03/1998. O critério de seleção foi a presença de lesões de mucosa bucal. Sendo esta amostra composta de 48 mulheres e 37 homens, com idade variando entre 16 a 91 anos (média de 52,8), das quais 78% possuíam renda mensal inferior a dois salários mínimos. As informações clínicas foram anotadas no prontuário individual.

Os grupos foram divididos por faixas etárias (abaixo de 40 anos e acima de 40 anos) e pelo hábito de fumar (fumantes e não fumantes). Foram categorizados como fumantes os pacientes que fumavam diariamente, no mínimo, cinco cigarros por

dia, nas diferentes formas de apresentação.

As lesões, através do diagnóstico histopatológico realizado com coloração padrão de HE, foram classificadas em três grupos, segundo a Organização Mundial da Saúde - OMS (PINDBORG et al., 1997): Grupo 1- lesões de origem traumática/inflamatórias, sem potencial de malignidade, hiperplasias fibrosas, fibroepiteliais e mucocèles, que por apresentarem o epitélio íntegro e dentro dos padrões próximos da normalidade, constituiu-se no grupo de referência (n=15); Grupo 2- lesões epiteliais proliferativas benignas, como os papilomas e condilomas, as estomatites nicotínicas, leucoplasias e líquen plano, segundo a classificação da OMS (n=36) e o Grupo 3- carcinomas espinocelular de boca (n=34).

A detecção de antígeno p53 foi realizada, aplicando-se a técnica APAAP (Alkaline phosphatase-Anti-AlkalinePhosphatase). Foram utilizados cortes de 5mm de espessura, montados em lâminas revestidas com organossilano. A recuperação antigênica foi feita em forno microondas por 15 min, em potência máxima, em tampão citrato, pH 6,0 (DOWELL, S. P.; OGDEN, G. R., 1996). Foram feitas incubações em soro normal de coelho, por 30 min, seguida do anticorpo primário, anti-p53, (DO-7, Dakopatts, Ca, USA), que reconhece epitopos residentes entre os aminoácidos 35 a 45 da p53 humana, tipo selvagem ou tipo mutante (IBRAHIN et al., 1996), por 16-18 hs, a 4°C. A seguir, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (Dakopatts Z259), seguindo incubação com APAAP por 30 min. A reação foi visualizada, utilizando Fast Red e contracoras com hematoxilina de Mayer. Em cada reação, foi utilizado como controle positivo, um carcinoma de células escamosas de boca, previamente positivo para p53. Como controle negativo, utilizou-se uma lâmina sem o anticorpo primário.

A leitura das lâminas de imunohistoquímica para p53 foi feita em microscópio óptico, considerando-se positivas as células com coloração especificamente nuclear. Em cada lâmina, foram contados os núcleos

em dez campos aleatórios do epitélio da lesão, bem como observado a intensidade de coloração. Foram classificadas em fracamente positivas, moderadamente positivas e fortemente positivas, as lesões que apresentavam respectivamente de 5 a 20%, 20 a 60% e acima de 60% dos núcleos corados independentes da intensidade da coloração. As lesões que apresentavam menos de 5% dos núcleos corados foram consideradas negativas.

Os dados foram agrupados e analisados estatisticamente, submetidos ao teste do χ^2 , teste exato de Fisher e χ^2 de Mc Newman, para verificação de correlação entre a expressão da proteína p53 e os demais dados dos pacientes, como idade, sexo, localização da lesão e hábito de fumar.

RESULTADOS

A marcação para p53 foi nuclear, homogênea e não havendo marcação de qualquer estrutura que não fossem as células epiteliais. Não foi encontrada diferença significativa entre a detecção da p53 e a localização anatômica da lesão na cavidade bucal.

A detecção da proteína p53 em relação aos grupos de lesão pode ser observada na Tabela I.

Foi encontrada diferença significativa entre a expressão da proteína p53 em carcinomas com as lesões benignas e as do grupo de referência.

No grupo II as lesões que coraram positivamente, se deram de forma leve e eram localizadas na camada basal e parabasal do epitélio (figura 1).

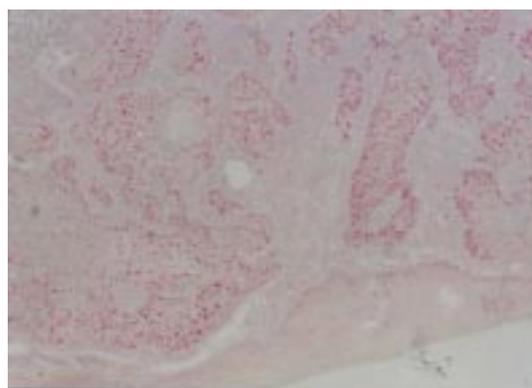


Figura 1- 100x – Imunohistoquímica para p53 positivo, epitélio acantótico, apresentando positividade leve e espaçada nas células da camada basal e parabasal.

Nos carcinomas, a marcação positiva foi, em geral, mais intensa (figura 2 e 3).

Tabela I - Número e percentual de pacientes, agrupados segundo o tipo em grupo de referência, lesões benignas e carcinomas da mucosa bucal, relacionadas com a expressão por imunohistoquímica da proteína p53.

Tipo	p53+		p53-		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Referência	1	6,7	14	93,3	15	42,4
Benignas	8	22,2	28	77,8	36	17,6
Carcinomas	19	55,8	15	44,2	34	40,0
Total	28	32,9	57	67,1	85	100

$P < 0,001$ $\chi^2 = 14,66$ G.L. = 2

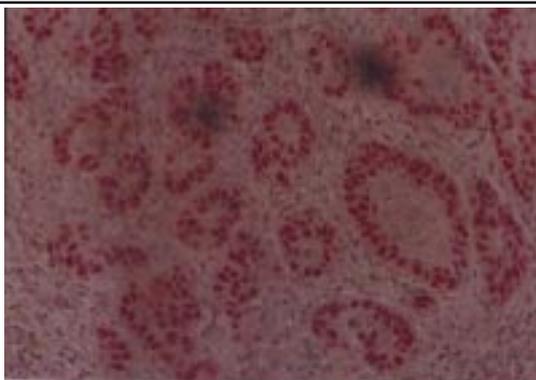


Figura 2 – 100x - Imunohistoquímica para p53 fortemente positiva, carcinoma espinocelular bem diferenciado, apresentando perolas de ceratina envolvidas por células proliferativas p53 positivas.

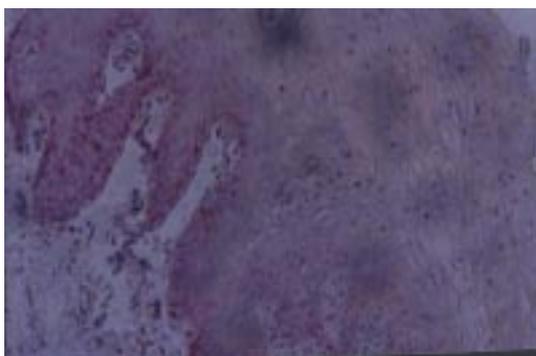


Figura 3 – 100x – Margem de carcinoma espinocelular bem diferenciado, apresentando áreas de imunohistoquímica fortemente positivas para p53 e áreas p53 negativas, a margem da lesão apresenta epitélio normal com algumas células fracamente coradas.

Em relação à intensidade de coloração, as lesões moderadas e fortemente coradas foram agrupadas e chamadas de forte, para maior representação estatística e pode ser observada na tabela II.

Na amostra geral, foi encontrada correlação altamente significativa entre a detecção da expressão da proteína e o hábito de fumar. Este hábito se apresentou distribuído pelos grupos da seguinte forma: 13,3% no grupo I; 47,2% no grupo II e 91,2% no grupo III. Ao Correlacionar-se o tabagismo com a p53, observou-se correlação altamente significativa entre a expressão da proteína e o hábito de fumar no grupo dos carcinomas. Neste grupo todos os carcinomas que expressaram p53 eram de fumantes, e os três casos de não fumantes foram p53 negativos. Nos não fumantes somente 3 casos foram p53 positivos.

Em relação ao sexo, as mulheres, que representavam 56,4% da amostra (48/85), apresentaram menor percentual (15%) de positividade para a p53 do que os homens (17%). Nos grupos, as mulheres obtiveram os seguintes percentuais de positividade, 10% no grupo I, 21,7% no grupo II e 46,6% no grupo III. Já os homens nenhum caso no grupo I, 23% no grupo II e 63,2% no grupo III. Não se observou correlação estatisticamente significativa entre sexo e expressão de p53.

Na amostra pesquisada, a idade média foi de 52,8 anos. Por grupo, a correlação entre idade e expressão de p53, não foi significante.

TABELA II - Número e percentual de pacientes que expressaram positivamente a proteína p53, agrupados segundo o tipo em: grupo de referência, lesões benignas e carcinomas da mucosa bucal, correlacionada com a intensidade de coloração.

Tipo	p53+ (forte)		p53+ (fraco)		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Referência	0	0,0	1	100	1	3,6
Benignas	1	12,5	7	87,5	8	28,6
Carcinomas	15	78,9	4	21,1	19	67,8
Total	16	57,1	12	42,9	28	100

$P < 0,001$ $\chi^2 = 11,53$ G.L. = 2

DISCUSSÃO

Os dados encontrados neste estudo com relação à detecção da expressão da proteína p53 em carcinoma bucais (55,8%), estão de acordo com os relatos de vários autores dentre eles: Mao et al. (1996), 41,5%; La et al. (1996), 78,9%; Nylander et al. (1996), 49%; Ibrahim et al. (1996), 68%; Yan; Tzeng; Jin, (1996), 45% e Gimenez-Conti et al. (1996), 51,7%. Gopalakrishnan et al. (1997), 40%. Nos carcinomas positivos 78,9% possuíam marcação forte para p53, resultado compatível com os relatados por Jin et al. (1998), e contrastando com os de Munirajan et al. (1996), 21%, Chiba et al. (1996), 24% e Kusama et al. (1996), 33,3%, que encontraram percentuais bem inferiores. Essas diferenças devem-se provavelmente a variações na metodologia utilizada.

A detecção da proteína no núcleo das células por imunohistoquímica representa na maioria das vezes, a sua forma mutada. Isso porque, quando alterada, a p53 selvagem que possui meia vida de cerca de 20 minutos fica mais estável, e por interferência no seu mecanismo de degradação, ocorre grande acúmulo no núcleo (LOYOLA et al., 1995; LAZARUS et al., 1996; CABALLERO; DANI; SIMPSON, 1998)

O percentual de mutações na amostra estudada pode ter sido subestimado, pois a técnica de imunohistoquímica, apesar de ser considerada satisfatória e amplamente utilizada, é inferior em relação a outros métodos, como o sequenciamento direto ou o SSCP (OGDEN et al. 1997), que permitem que mutações nonsense e deleções sejam detectadas (VOGELSTEIN.; KINZLEY, 1992; VELCULESCU; EL-DEIRY,, 1996). Assim, o fato de 78,9% dos carcinomas apresentarem forte expressão de p53 reflete o comprometimento desse gene no estado mutado com as lesões malignas e o hábito de fumar.

Nas lesões benignas, a detecção de p53 pode ser um indicador importante para o prognóstico e evolução à malignidade, como afirmam Mao et al.

(1996); Chiba et al. (1996); Murti et al. (1998) e por Triverdy et al. (1998). No entanto, Dowell; Ogden, (1996) e Ogden et al. (1997), chamam a atenção a respeito da quando da detecção por imunohistoquímica de p53. Isso porque, após a introdução do pré-tratamento do material embebido em parafina, em ambiente de microondas, a sensibilidade do método que era mais baixa, ampliou-se em três vezes. Esses afirmam que a positividade de p53 em tecido normal e lesões benignas, coradas fracamente e localizadas na camada basal ou suprabasal, não deve ser considerada como mutação de p53 e sim como a atividade normal de reparo desta proteína na camada germinativa do epitélio. Essa opinião é compartilhada por Piffkó et al. (1995), Li et al. (1996), Copete; Wendt; Chen, (1997).

Nas lesões benignas da amostra pesquisada, 22,2% apresentaram positividade para p53, sendo que sete dos oitos foram fracamente coradas, e a coloração se limitava às células da camada basal e suprabasal. Esses dados estão de acordo com os observados por MAO et al. (1996), que encontraram 33,3% de positividade em lesões benignas e com as de PIFFKÓ et al. (1995), que encontraram 28,5%, em margens livres de tumor, acrescentado-se, ainda, que tanto no grupo de lesões benignas como no grupo de referência, a p53 não foi detectada em sua maioria, sugerindo que a p53 só é chamada a exercer sua função, quando em presença de agentes mutagênicos. Contrariamente, Dowell; Ogden (1996) encontraram 97,2% de positividade para p53 em sua amostra de lesões benignas, Copete ;Wendt; Chen (1997), 93% em sua amostra de papilomas e Gopalakrishnan et al. (1997), 70% em leucoplasias. Entretanto esses autores relatam que a localização da detecção deteve-se na camada basal, em sua maioria, apresentava-se fracamente coradas.

Piffkó et al. (1995) estão entre os primeiros a discutir essa fraca expressão de p53 nas camadas basal e justa basal. Esses autores compararam os

achados da presença de p53 nas margens não neoplásicas com as neoplásicas de carcinomas de mucosa, encontrando positividade em 77% nas amostras das margens, contra 40% da encontrada nas áreas neoplásicas dos carcinomas. No entanto, as amostras das margens foram todas fracamente coradas e localizadas na camada basal, enquanto que as neoplásicas apresentavam-se, em sua maioria, fortemente coradas. Os autores justificam esses achados com três possibilidades: 1- as alterações de p53 representam eventos precoces na carcinogênese oral; 2- estas áreas representam campos potenciais de cancerização destas lesões e/ou 3- são simplesmente indicativas de atividade normal de p53, atuando no reparo da célula.

A correlação entre o tabaco e os diversos tipos de câncer do pulmão, das vias aéreas superiores e da cavidade bucal foram estabelecidas há várias décadas. Na amostra total, observou-se significância entre a expressão de p53 e o hábito de fumar. Dos pacientes com carcinomas, 91,2% eram fumantes, sendo que 61,3% foram p53 positivos e os três pacientes não fumantes foram p53 negativos. Estes achados são importantes, porque indicam a associação entre o papel carcinogênico do tabaco e as mutações de p53, facilitando a progressão e um pior prognóstico da doença (MURTI et al., 1998). Esta associação fica mais evidente ainda, quando se consideram os pacientes não fumantes, dos quais apenas 3 (8,6%) foram p53 positivos. Em adição, 6 dos 8 casos com expressão de p53 positiva no grupo II e o único caso positivo encontrado no grupo de referência, possuíam o hábito de fumar, sugerindo que os achados de p53, na camada basal do epitélio fracamente corados, seja a atividade de p53 tipo selvagem, como relatam Piffkó et al. (1995), Ibrahim et al. (1996), Lazarus et al. (1996), Ogden et al. (1997) e Murti et al. (1998),

Apesar de não ser encontrada correlação significativa entre idade e expressão de p53, existe

uma tendência da expressão de p53 ser mais freqüente em pacientes de idades mais avançadas. Isto provavelmente se deve ao maior tempo de exposição a agentes carcinogênicos. Esses achados concordam com os relatados por Loyola ;Borra ;Araujo, (1995), Piffkó et al. (1995), Yan et al. (1996), e por Jin et al. (1998). Não foi encontrada, também, uma correlação entre o local da lesão e a expressão da p53, corroborando com Loyola; Borra; Araújo,(1995) e Ibrahim et al. (1996)

Assim, com a análise dos resultados obtidos na amostra, foi possível concluir: a expressão de p53 mostrou-se um evento vinculado a malignidade, visto que, na quase totalidade do grupo de referência e na maioria das lesões benignas, a expressão de p53 não foi observada, e quando o foi, se fez fracamente, sendo a maioria destes em pacientes expostos ao tabaco. O hábito de fumar apresentou correlação altamente significativa com a expressão de p53 ($p=0,001$), sugerindo que este carcinógeno estimule a síntese de p53 para reparar os danos ao DNA por ele provocados e, provavelmente, seja responsável por mutações no próprio gene p53. A expressão de p53 não foi vinculada à localização da lesão nem possui predominância quanto ao sexo, embora exista uma tendência do aumento do aparecimento da mutação com o aumento da idade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ARROWSMITH, H.C.; MORIN, P., New insights p53 function in structural studies. **Oncogene**, v. 12, p.1379-1385, 1996.
- 2 - BÁLINT, É.; VOUSDEN, K. H., Activation and activities of the p53 tumor suppressor protein. **British Journal of Cancer**, v. 82, n.12, p. 1813-23, 2001.
- 3 - BRASIL, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação dos Programas de Controle do Câncer / Pro-Onco - Estimativa de incidência e

- mortalidade por câncer no Brasil para 2003. Rio de Janeiro, 2003.
- 4 - Brazil – a case-control study. **Int. J. Cancer**, v 43, p 992-1000, 1989.
- 5 - CABALLERO, O.L.; DANI, S. U.; SIMPSON, A. J.G., Oncogenes e genes supressores de tumores. In: BRENTANI, M.M. et. al., **Bases da oncologia** São Paulo: Lemar, 1998 p. 53-69.
- 6 - CHIBA, I.; SHINDOH, M.; YASUDA, M.; et al., Mutations in the p53 gene and human papillomavirus infection as significant prognostic factors in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **Oncogene**, v. 12, p. 1663-1668, 1996.
- 7 - CHO, Y.; GORINA, S.; JEFFREY, P.D.; PAVLETICH, N.P., Crystal structural of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations. **Science**, v. 265, p. 346-355, 1994.
- 8 - COPETE, M.A.; WENDT, K.; CHEN, S.Y., Expression of p53, ki-67 and cytokeratin-4 (CK4) in oral papillomas. **J. Oral Pathol. Med**, v. 26, p. 211-216, 1997.
- 9 - CROOK, T.; FISHER, C.; MASTERSON, P. J.; VOUSDEN, K. H., Modulation of transcriptional regulatory properties of p53 by HPV E6. **Oncogene**, v. 9, p.1225-1230, 1994.
- 10 - DOWELL, S.P.; OGDEN, G.R., The use of antigen retrieval for immunohistochemical detection of p53 overexpression in malignant and benign oral mucosa: a cautionary note. **J. Oral Pathol. Med**, v. 25, p. 60-64, 1996.
- 11 - FRANCO, E.L.; KOWALSKI, L.P.; OLIVEIRA, B.V.; et. al., Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int. J. Cancer**, v.43, p. 992-1000, 1989.
- 12 - GIMENEZ-CONTI, I.B.; COLLET, A.M.; LANFRANCHI, H.; et al., p53, Rb, and cyclin D1 expression in human oral verrucous carcinomas. **Cancer**, v.78,n.1,p.17-23, 1996.
- 13 - GOPALAKRISHNAN, R.; WEGHORST, C..M.; LEHMAN, T.A.; et al., Mutated and wild-type p53 expression and HPV integration in proliferative verrucous leucoplakia and squamous cel carcinoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 83, n. 4, p. 471-477, 1997.
- 14 - IBRAHIM, S.O.; JOHANNESSEN, A.C.; IDRIS, A.M.; et al., Immunohistochemical detection of p53 in non-malignant hand malignant oral lesions associated with snuff dipping in the Sudan and Sweden. **Int. J. Cancer**, v. 68, p. 749-753, 1996.
- 15 - JIN, Y.T.; KAYSER, S.; KEMP, B.L.; et al., The prognostic significance of the biomarkers p21, p53 and bcl-2 in laringeal squamous cel carcinoma. **Cancer**, v. 82, n. 11, p. 2159-2165, 1998.
- 16 - KOWALSKI, L.P.; MAGRIN, J.; RIEIRA, C.; COELHO, F.R. e ZEFERINO, L.C., Modelo de programa de prevenção e detecção precoce do câncer bucal. **Saúde em Debate**, v. 32, p. 66-71, 1991.
- 16 - KUSAMA, K.; OKUTSU, S.; TAKEDA, A.; et al., p53 Gene alterations and p53 protein in oral epithelial dysplasia and squamous cel carcinoma. **J. Pathol.**, v.178, p.415-421, 1996.
- 17 - LAN, H.A.; ZAIN, R.B.; SAITOH, M.; et al., Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of oral mucosa - a marker for poor tumor differrentiation, increasing nuclear atypia and invasiveness? **Anticancer Res.**, v. 16, p. 3059-

3066, 1996.

- 18 - LAZARUS, P.; STERN, J.; ZWIEBEL, N.; FAIR, A.; RICHIE, J.P. JR; SCHANTZ, S., Relationship between p53 incidence in oral cavity squamous cell carcinomas and patient tobacco use. **Carcinogenesis**, v. 17, n. 4, p. 733-739. 1996.
- 19 - LI, T.J.; BROWNE, R.M.; PRIME, S.S.; et al., p53 expression in odontogenic keratocyst epithelium. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 25, p. 249-255, 1996.
- 20 - LOPES, E.R.; MENDONÇA, G.A.S.; GOLDFARB, L..M.C.S.; et al., Câncer e meio ambiente, Tabaco- agrotóxicos - radiações- dieta. Um documento para a Conferência Mundial de Ecologia. **Rev. Bras. de Cancerol.**, v. 38, n.1, p. 35-64, 1992.
- 21 - LOYOLA, A. M.; BORRA, R. C.; ARAÚJO, V. C., Expressão da proteína p53 em carcinomas epidermóides de mucosa bucal. **RPG- Rev. Pos-grad.**, v. 12, n. 2, p. 52-58, 1995.
- 22 - MAO, E.J.; SCHWARTZ, S.M.; DALING, J.R.; ODA, D.; TICKMAN, L.; BECKMANN, A.M., Human papilloma viruses and p53 mutations in normal, pre-malignant and malignant oral epithelia. **Int. J. Cancer**, v. 69, p.152-158, 1996.
- 23 - MUNIRAJAN, A.K.; TUTSUMI-ISHII, Y.; MOHANPRASAD, B.K.C.; et al., p53 Gene mutations in oral carcinomas from India. **Int. J. Cancer**, v. 66, p. 297-300, 1996.
- 24 - MURTI, P.R.; WARNAKULASURIYA, K.A.; JOHNSON, N.W.; et al. p53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential. **J. Oral Pathol. Med**, v. 27, p. 191-196, 1998.

