



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Expressão Imunoistoquímica das proteínas Bcl-2, p16^{INK4a} e
Ciclina D1 em Carcinomas Epidermóides de Lábio**

Nircleny da Silva Almeida

MANAUS, 2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nircleny da Silva Almeida

**Expressão Imunoistoquímica das Proteínas Bcl-2, p16^{INK4a} e
Ciclina D1 em Carcinomas Epidermóides de Lábio**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte dos Requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de Concentração: Promoção de Saúde na Amazônia.

Orientadora: Prof. Dra. Tatiana Nayara Libório dos Santos

Co-Orientadora: Prof. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier

Manaus, 2012

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

A447e Almeida, Nircleny da Silva
Expressão Imunoistoquímica das Proteínas Bcl-2, p16INK4a e
Ciclina D1 em Carcinomas Epidermóides de Lábio / Nircleny da
Silva Almeida. 2012
107 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Tatiana Nayara Libório dos Santos
Coorientadora: Flávia Caló de Aquino Xavier
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Carcinoma Epidermóide labial. 2. Queilite actínica. 3. Lesões
reativas. 4. Imunoistoquímica. 5. Ciclinas. I. Santos, Tatiana Nayara
Libório dos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Nircleny da Silva Almeida

**Expressão Imunoistoquímica das Proteínas Bcl-2, p16^{INK4a} e
Ciclina D1 em Carcinomas Epidermóide de Lábio**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas como parte dos Requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde na área de Concentração: Promoção de Saúde na Amazônia

Aprovada em: 12-11-2012

Banca examinadora

Prof. Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira

Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM)

Prof. Dra. Tatiana Nayara Libório dos Santos

Universidade Federal do Amazonas

Dra Katia Luz Torres Silva

Fundação de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON)

Dedicatória

Sempre agradecendo a Deus, porque nada sem Ele é possível.

Aos meus pais **Francisco e Nilza**, pelo amor incondicional, esforço, carinho e doação integral, pelas inúmeras abdições para criação e educação tanto minha quanto a dos meus irmãos, meu amor por vocês é sem fim.

Aos meus irmãos, **Nilfran, Fabíola e Fábio** pelo amor, felicidade e alegria que sempre me trazem. A nossa união é linda e se Deus quiser vai durar muitos anos, amo vocês.

Ao meu amor, meu marido lindo, meu companheiro de tantos anos pelo amor, carinho, companhia, paciência e ajuda para o término deste trabalho. **Amo você Alan.**

Agradecimentos

A **Deus** por me dar saúde e força para seguir todos esses caminhos.

Agradecer a minha orientadora **Prof. Dra. Tatiana Nayara Libório** dos Santos, pela dedicação constante, pelos conselhos preciosos, estímulo constante, força e esperança nos momentos mais críticos, paciência, transparência e honestidade. Toda vez que me perdia ela vinha e me resgatava. Com certeza uma das pessoas mais inteligente e perspicaz com que trabalhei sem você nada teria sido possível, meu profundo respeito e admiração por você é crescente.

Ao **prof. MsC. Jeconias Câmara** pelas análises das amostras, pela paciência, conselhos e dedicação com a qual abordou nosso projeto. Foi também meu professor de graduação e desde lá tem meu respeito e admiração.

Ao prof. **Dr. Luiz Carlos de Lima Ferreira** da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas pela recepção, disponibilidade e auxílio em nossas pesquisas. Sem o qual não teríamos como dar seguimento ao nosso projeto.

A **Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier**, minha co-orientadora que mesmo de longe sempre me ajudava no seguimento do projeto, aconselhando como também me orientando para um melhor resultado.

Ao **Dr. Paulo Benevides**, pelo carinho, dedicação e por mostra-me os caminhos do Fcecon, sempre mostrando interessando pelo projeto e me ajudando nesse percurso.

À **Dra. Kátia Torres**, pela atenção, cuidado e simpatia orientando meus passos na Fcecon,

A **Dra. Rosilene** por abrir as portas junto com o Dr. Paulo do Fcecon.

Ao **Dr. Nelson Fraji**, coordenador do curso.

A todos os técnicos do Departamento de Patologia da UFAM, principalmente a **Creusimar** que com toda simpatia, vontade, bom humor e de um imenso coração me ajudou na parte técnica do projeto, um grande beijo no coração Creusimar.

Aos técnicos do Fcecon, principalmente a **Joanilia** que me acompanhou na retirada dos blocos desta instituição, encarou de frente (literalmente!!!) uma sala enorme, quente e lotada de blocos parafinados os quais deveríamos “catar” de um por um e lamentar pelos que sumiram e derreteram.

Aos técnicos do FMTAM, principalmente ao Carlos Marques, vulgo **Carlinhos**, pelo carinho, pela preocupação e pela ajuda imensurável que me prestou para realização das reações, um enorme abraço.

À **Andrea** que realizou projeto de Pibic como parte integrante desse projeto.

Agradecer minha mãe de novo, **Nilza Almeida**, sempre me incentivou a ir mais adiante quase me forçando (papel de mãe), praticamente me inscreveu no mestrado, dizendo que eu tinha que para de trabalhar um pouco, nem sabe ela que o trabalho foi dobrado. Beijo grande mãe e muito obrigada.

Ao meu marido novamente, **Alan Almeida**, meu companheiro maravilhoso, ele com certeza vai fazer uma festa do dia da defesa.

As minhas Acds queridas, **Regina e Helda**, por cuidarem do nosso consultório, aguentando as pontas de tantas remarcações que tivemos que fazer para concluir meu trabalho.

A minha querida e sempre amiga **Felícia Góes** por sempre estar do meu lado ao longo do trabalho, minha excelente madrinha que na véspera do meu casamento estava comigo no Fcecon para procurar os últimos (que não foram...) blocos parafinados, beijo grande.

A minha irmã linda **Fabíola Almeida**, por tudo que você é, dedicada, solícita, excelente irmã, amorosa, não tenho nem palavras, sempre me ajudando nos meus projetos, foi ela quem me apresentou o computador!!!

Aos meus todos os meus amigos do mestrado, principalmente a **Lorisa, João Paulo e Marina** que se tornaram meus amigos para a vida.

A minha queria amiga **Cristiane Nagai**, vulgo, Crisinha, mestre linda, que me acompanhou em todo o processo do mestrado e foi a primeira pessoa que me deu a notícia que eu tinha passado na seleção, beijo amiga.

Quero agradecer a nossa **Universidade Federal do Amazonas**, Universidade na qual me graduei e terminei meu mestrado. Só tenho a agradecer.

Ao **Anticorpos laboratório**, pela parceria na realização de parte das minhas reações.

Ao **Mestrado de Ciências da Saúde** da Universidade Federal do Amazonas.

A **CAPES**, pela bolsa de estudo fornecida.

RESUMO

Introdução: O carcinoma epidermóide de lábio (CEL) é um problema de saúde pública encontrado em vários países ao redor do mundo, existindo uma escassez de dados a respeito da sua incidência na região Norte do Brasil. O estudo dos marcadores do ciclo celular realizado através de técnicas imunoistoquímica constitui uma ferramenta útil para detecção de alterações nesses marcadores. **Objetivo:** Nesse estudo propusemo-nos avaliar a expressão imunoistoquímica do Bcl-2, p16^{INK4a} e ciclina D1 em carcinomas epidermóides de lábio, levando em consideração graduação e área histológica e percentual de marcação. Para tanto foram realizadas reações imunoistoquímica com os anticorpos anti- Bcl-2, anti-p16 e anti-ciclina D1 em 14 a 16 amostras dependendo do anticorpo em questão. **Metodologia:** As lâminas histológicas selecionadas de CELs foram classificadas segundo a OMS (2005) e cada caso de CEL foi avaliado de acordo com a presença de áreas histológicas e percentual de marcação. Foi realizado Teste Exato de Fisher e Teste T de Student. **Resultados:** Os resultados obtidos revelaram maior incidência no sexo feminino (53%), 67% em região labial inferior e 70% em raça parda. A expressão da proteína Bcl-2 foi de 42,8%, sendo 60% moderadamente diferenciados, havendo 66,6% de marcação em cordões de células neoplásicas e 83,3% em até 25% de células. Para a proteína p16^{INK4a} foi encontrada 68,7% de expressão e destes, 63,6% eram bem diferenciados predominando marcação em pérolas de queratina de 43,7%, massas, lençóis e ilhas de células neoplásicas com 37,5%, o predomínio de marcação foi de 72,7% em até 25% de células marcadas. **Conclusão:** A expressão da ciclina D1 foi de 37,5% positivos e, destes, 45,4% eram bem diferenciados, havendo 100% de marcação em cordões de células neoplásicas, seguidas por 50% de marcação em lençóis massas e ilhas e pérolas, sendo que 66,6% apresentaram marcação em até 25% de células. Sugere-se que a expressão das três proteínas entre si no CEL ocorra de maneira que Bcl-2 e ciclina D1 estejam diminuídas e a p16^{INK4} esteja aumentada nessas lesões.

Palavras Chave: Carcinoma Epidermóide labial, queilite actínica, lesões reativas, imunoistoquímica, ciclinas, p16^{INK4a}, Bcl-2.

ABSTRACT

Background: Squamous cell carcinoma of the lip (CEL) is a public health problem found in many countries around the world, there is a paucity of data regarding its incidence in northern Brazil. The study of markers of cell cycle performed by immunohistochemical techniques constitutes a useful tool for detecting changes in these markers. In this study we decided to evaluate the immunohistochemical expression of Bcl-2, p16^{INK4a} and cyclin D1 in squamous cell carcinomas of the lip, considering undergraduate and histological area and percentage markup. For both reactions were performed immunohistochemistry with anti-Bcl-2, anti-p16 and anti-cyclin D1 in 14 to 16 samples depending on the antibody in question. **Methodology:** The histological slides of selected cels were classified according to WHO (2005) and each case of CEL was evaluated according to the presence of histologic areas and percentage markup. Fisher's exact test and Student's t test were conducted. **Results:** Results revealed a higher incidence in females (53%), 67% lower labial region and 70% in mulatto. The expression of Bcl-2 was 42.8%, 60% moderately differentiated, with 66.6% of marking strands of neoplastic cells and 83.3% to 25% of cells. For the protein p16^{INK4a} was found 68.7% of expression and of these, 63.6% were well differentiated predominantly marking keratin pearls 43.7%, pasta, sheets and islands of neoplastic cells with 37.5%, the predominant markup was 72.7% up to 25% of labeled cells. **Conclusion:** The expression of cyclin D1 was 37.5% positive and of these, 45.4% were well differentiated, with 100% markup on cords of neoplastic cells, followed by 50% markup on pasta sheets and islands and pearls, and that 66.6% had dial up to 25% of cells. It is suggested that the expression of three proteins CEL occur together in such a way that Bcl-2 and cyclin D1 and p16^{INK4} are reduced is increased in these lesions.

Keywords: lip squamous cell carcinoma, actinic cheilitis, reactive lesions, immunohistochemistry, cyclins, p16^{INK4a}, Bcl-2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|------------------|---|-----------|
| Figura 1 | Papel do p16 e da CDK4 na regulação do ciclo celular. | 33 |
| Figura 2 | Lâminas para imunistoquímica mostrando controle positivo e negativo. | 40 |
| Figura 3 | Carcinoma epidermóides labial bem diferenciado – Marcação de AE1 e AE3 - Aumento de 100x (A) e 400x (B). | 61 |
| Figura 4 | Carcinoma de células escamosas bem diferenciado (BD) evidenciando cordões de células neoplásicas-HE-Aumento de 100x; B: Carcinoma epidermóide de lábio bem diferenciado (BD) – pérola de queratina –HE- Aumento de 100x; C: Carcinoma epidermóide labial moderadamente diferenciado (MD) evidenciando cordões de células neoplásicas- HE- Aumento de 100x; D: Carcinoma epidermóide labial pouco diferenciado (PD) evidenciando numerosas mitoses atípicas-HE- Aumento de 100x. | 61 |
| Figura 5 | Carcinoma epidermóide de lábio: (A) visualização de uma ilhota – Aumento de 400x; (B) cordão e ilhota de células neoplásicas – Aumento de 400x; (C) lençóis/massas e ilhas com células isoladas alongadas – Aumento de 200x; (D) Pérolas de queratina – Aumento de 100x; | 62 |
| Figura 6 | Expressão da proteína Bcl-2 em carcinoma epidermóides de lábio. (A) HE de câncer de lábio exibindo cordão e ilhota com infiltrado inflamatório; (B) IHQ de corte pareado de (A) exibindo positividade do cordão e ilhota e marcação do controle endógeno (infiltrado); (C) HE de Massa de células neoplásicas; (D) IHQ pareando de massa de células neoplásicas exibindo um infiltrado logo acima marcado; (E) HE exibindo células isoladas; (F) IHQ pareando com HE mostrando marcação de células neoplásicas- (A) e (B)- aumento de 400x; (C) e (D)- Aumento de 200x e (E) e (F)-Aumento de 100x. | 63 |
| Figura 7 | Carcinoma epidermóide de lábio com expressão citoplasmática da proteína Bcl-2 no epitélio – Aumento 400x. | 64 |
| Figura 8 | Queilite actínica: (A) HE mostrando epitélio com elastose no tecido conjuntivo; (B) IHQ de Bcl-2 mostrando marcação citoplasmática; (C) HE exibindo área de queratinização logo acima do epitélio com elastose no tecido conjuntivo; (D) IHQ de Bcl-2 pareando com HE do (C) e mostrando em um maior aumento área de marcação – Aumento (A) e (B) 200x e (C) e (D) aumento de 100x – Aumento de 400x. | 64 |
| Figura 9 | Lesões reativas: (A) HE de fibrolipoma-Aumento de 200x; (B) mesmo caso que de (A) marcação de Bcl-2- Aumento de 400x. | 64 |
| Figura 10 | Carcinoma epidermóide de lábio; (A) HE de CEL moderadamente diferenciado exibindo pérolas e cordões; (B) IHQ de p16 do mesmo caso de (A) exibindo positividade de pérolas, lençóis, massas/ ilhas e cordões; (C) HE de CEL moderadamente diferenciado mostrando cordões de células neoplásicas; (D) IHQ de p16 pareando com o (C) mostrando | 65 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| | positividade dos cordões; (E) HE de CEL bem diferenciado exibindo massas/lençóis/ilhas e pérola (F) IHQ exibindo positividade de pérola marcada; (G) HE de CEL bem diferenciado mostrando pérola em formação; (H) IHQ de p16 pareando com (F) mostrando pérola marcada – Aumento de 200x (A), (B), (C) e (D); (E) e (G) de 200x; (F) e (H) de 400x. | |
| Figura 11 | CEL de lábio bem diferenciado exibindo marcação citoplasmática em epitélio adjacente a lesão- Aumento de 200x. | 66 |
| Figura 12 | Queilite actínica; (A) IHQ de p16 de QA moderada e baixo risco mostrando marcação da camada basal e suprabasal; (B) IHQ de ciclina p16 do mesmo caso de (A) porém em maior aumento mostrando citoplasma de células do epitélio com marcação positiva; (C) IHQ de QA Discreto e baixo risco mostrando epitélio e elastose solar; (D) IHQ de p16 do mesmo caso exibindo marcação basal. – Aumento de 100x (A); (B) 200x; (C) e (D) e 400x. | 66 |
| Figura 13 | Fibroma-Aumento de 100x; (B) p16 citoplasma marcado, porém pode-se visualizar marcação nuclear por Ki67- Aumento de 200x. | 66 |
| Figura 14 | Carcinoma epidermóide de lábio; (A) HE de CEL bem diferenciado exibindo marcação de pérolas e cordões de células neoplásicas; (B) IHQ de ciclina D1 do mesmo caso de (A) exibindo positividade dos cordões e pérolas; (C) HE de CEL bem diferenciado mostrando pérolas de queratina e massas/lençóis e ilhas; (D) IHQ de ciclina D1 pareando com o (C) mostrando positividade das pérolas de queratina e massas/lençóis e ilhas s; (E) HE de CEL moderadamente diferenciado exibindo cordões de células neoplásicas (F) IHQ do mesmo caso de (E) mostrando positividade dos cordões marcados; (G) HE de CEL moderadamente diferenciado mostrando pérola em formação; (H) IHQ de ciclina D1 pareando com (F) mostrando pérola marcada – Aumento de 200x (A), (C); (D) e (E); (B) de 100x; (G) (F) e (H) de 400x. | 67 |
| Figura 15 | Queilite actínica; (A) HE de QA moderada e baixo risco mostrando bastante queratinização e epitélio; (B) IHQ de ciclina D1 do mesmo caso de (A) em um maior aumento exibindo positividade de células na camada suprabasal; (C) HE de QA Discreto e baixo risco mostrando epitélio com uma camada de queratina e elastose solar; (D) IHQ de ciclina D1 do mesmo caso de (C) mostrando positividade de marcação no epitélio na camada suprabasal e basal – Aumento de 200x (A), (C); (D) e 400x (B); | 68 |
| Figura 16 | Mucocele – Aumento de 100x; (B) Expressão de ciclina D1 do mesmo caso-Aumento de 200x | 68 |
| Gráfico 1 | Distribuição do câncer labial segundo o sexo e raça | 46 |
| Gráfico 2 | Gráfico 2: Distribuição quanto a localização da lesão e faixa etária. | 46 |
| Gráfico 3 | Distribuição da graduação histológica nas amostras de carcinoma epidermóide de lábio | 47 |
| Gráfico 4: | Distribuição de áreas histológicas encontradas nos carcinomas | 47 |

| | | |
|-------------------|--|-----------|
| | epidermóides de lábio. | |
| Gráfico 5 | Distribuição da proteína Bcl-2 de acordo com as áreas histológicas presentes somente nos casos positivos para essa proteína. | 50 |
| Gráfico 6 | Distribuição da marcação positividade da proteína p16 em áreas histológicas. | 52 |
| Gráfico 7 | Distribuição da marcação positividade da proteína ciclina D1 em áreas histológicas. | 54 |
| Gráfico 8 | Distribuição da positividade nos grupos | 56 |
| Gráfico 9 | Distribuição do percentual de marcação no grupo dos carcinomas epidermóides labiais | 57 |
| Gráfico 10 | Distribuição da marcação positiva de áreas histológicas para as proteínas Bcl-2, p16 e Ciclina D1 em carcinoma epidermóide de lábio. | 57 |
| Gráfico 11 | Distribuição da graduação da análise semiquantitativa dentro do grupo da queilite actínica | 58 |
| Gráfico 12 | Distribuição da marcação positiva de áreas morfológicas para as proteínas Bcl-2, p16 e Ciclina D1 em queilite actínica. | 58 |
| Gráfico 13 | Distribuição da graduação da análise semiquantitativa dentro do grupo da lesão reativa de lábio. | 59 |
| Gráfico 14 | Distribuição da marcação positiva de camadas do epitélio para as proteínas Bcl-2, p16 e Ciclina D1 em lesão reativa. | 59 |

LISTA DE TABELAS E QUADROS

| | | |
|-----------------|--|-----------|
| Quadro 1 | Classificação de displasias segundo Kujan (2006). | 23 |
| Quadro 2 | Anticorpos utilizados no trabalho e suas especificações. | 39 |
| Tabela 1 | Análise descritiva e semiquantitativa dos carcinomas epidermóides de lábio. | 44 |
| Tabela 2 | Análise descritiva semiquantitativa das queilites actínicas. | 44 |
| Tabela 3 | Distribuição da positividade para o grupo dos carcinomas epidermóides labiais. | 56 |
| Tabela 4 | Distribuição da positividade no grupo dos carcinomas epidermóides labiais, dentro da classificação histológica e do número de casos que os compõe. | 56 |
| Tabela 5 | Distribuição da positividade para o grupo de queilites actínicas. | 58 |
| Tabela 6 | Distribuição da positividade para o grupo das lesões reativas. | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLO

BD Bem diferenciado

Ca Cálcio

CDKS Quinase dependentes de Ciclina

CEL Carcinoma Epidermóide de Lábio

CEB Carcinoma Epidermóide de Boca

CE Carcinoma Epidermóide

DAB Diaminobenzidina

DNA Ácido desoxirribonucleico

DPML Departamento de Patologia e Medicina Legal

EDTA Etyledeniamine Tretraacetic Acid

E2F-1 Fator de Transcrição

FMT-HVT Fundação de medicina Tropical do Amazonas

HE Hematoxilina Eosina

IHQ Imunoistoquímica

MD Moderadamente diferenciado

OMS Organização Mundial de Saúde

PD Pouco diferenciado

pRB Dinucleotídeos

p16^{INK4a} Ciclina dependente de Quinase

QA Queilite Actínica

RNA Ácido Ribonucleico

UVB Radiação Ultra Violeta

TRIS Hidroxi- metil aminometano

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 Epidemiologia | 18 |
| 2.2 Fatores de risco | 19 |
| 2.3 Carcinogênese do lábio | 20 |
| 2.4 Ciclo Celular | 25 |
| 2.4.1 Controle do Ciclo Celular | 26 |
| 2.4.2 Bcl-2 | 28 |
| 2.4.3 p16^{INK4a} | 31 |
| 2.4.4 Ciclina D1 | 33 |
| 3. OBJETIVOS | 36 |
| 4 METODOLOGIA | 37 |
| 4.1 Modelo de Estudo | 37 |
| 4.2 Universos de Estudo | 37 |
| 4.3 Informações Éticas | 38 |
| 4.4 Procedimento | 38 |
| 4.5 Análise das Amostras | 41 |
| 4.5.1 Análise descritiva do HE | 41 |
| 4.5.2 Análise descritiva e semiquantitativa da imunoistoquímica | 41 |
| 5 RESULTADOS | 46 |
| 6 DISCUSSÃO | 69 |
| 7 CONCLUSÃO | 89 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 90 |
| OBRAS CONSULTADAS | 98 |
| APÊNDICES | 100 |
| ANEXOS | 108 |

1. INTRODUÇÃO

Segundo o INCA (2008), o câncer de boca inclui os cânceres de lábio e de cavidade oral. Nesse contexto, o câncer de lábio é o tumor mais comum da boca e corresponde a 25% das neoplasias malignas dessa localização (VISSCHER et al., 1998, PEREIRA-FILHO et al., 2011). Pacientes caucasianos, cabelos loiros ou ruivos e com pouca capacidade de bronzeamento e que estão diretamente relacionados à exposição solar prolongada são considerados pacientes de risco para o surgimento de qualquer lesão acometida em pele, devido à radiação ultravioleta como a queratose solar, queilite actínica, carcinoma de células basais em pele e o carcinoma epidermóide de lábio (KAUGARS et al., 1999; MAIN& PAVONE 1994; SASSI et al., 2010). A principal localização do carcinoma epidermóide de lábio (CEL) é o lábio inferior em relação ao superior, devido à projeção da incidência solar nessa área (VISSCHER et al., 1998, KORNEVS et al., 2005; PEREIRA-FILHO et al., 2011; SOUZA et al., 2011).

Existem estudos que envolvem diversos marcadores do ciclo celular relacionados ao câncer por meio de expressão de suas proteínas, correspondendo a abordagens atuais e promissoras para compreensão das alterações celulares que levam a esse fenômeno, porém, poucos abordam esse processo na região de lábio. Com base nesses aspectos, propusemo-nos estudar a expressão de alguns dos marcadores do ciclo celular como o Bcl-2, p16^{INK4a} e ciclina D1 em carcinomas epidermóides de lábio, e ainda verificar uma possível expressão diferencial entre elas.

O presente estudo teve como objetivo principal verificar a expressão imunohistoquímica das proteínas Bcl-2, p16^{INK4a} e Ciclina D1 em amostras de pacientes portadores de carcinomas epidermóides de lábio (CEL) a fim de conhecer melhor o seu perfil

nessas lesões. Adicionalmente nessas amostras, foi realizada uma comparação da expressão dessas proteínas com a expressão observada em amostras de pacientes portadores de queilites actínicas (QA) e lesões reativas lábio inferior. Finalmente uma comparação da expressão dessas proteínas entre si foi realizada a fim de verificar perda ou ganho dessa expressão durante o processo de carcinogênese labial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia

Segundo o Ministério da Saúde, o câncer configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países subdesenvolvidos. Foram estimados para o Brasil, em 2012, também válidos para o ano de 2013, cerca de 518.510 novos casos de câncer, dos quais 14.170 casos acometerão a cavidade oral (9.990 no gênero masculino e 4.180 no gênero feminino), comparando dados da última estimativa foi observado um decréscimo nos casos do gênero masculino e um aumento nos casos do gênero feminino (INCA, 2010).

Mundialmente, o câncer de boca é considerado o sexto mais frequente, com variações regionais de incidência e mortalidade, sendo o carcinoma epidermóide responsável por aproximadamente 95% do total de casos. O carcinoma epidermóide de boca (CEB), também denominado de carcinoma espinocelular, carcinoma de células escamosas e carcinoma escamocelular, é uma neoplasia maligna que se origina do epitélio de revestimento bucal. (JOHNSON, 1991; MOORE; JOHNSON; PIERCE, 2000; BRASIL, 2002).

O perfil do paciente portador de CEB está representado principalmente por homens, acima dos 40 anos de idade, cujos locais mais acometidos são lábio inferior, língua e assoalho bucal (BRENER et al., 2007). Durazzo et al. (2005) em estudos realizados na Escola Universitária de Medicina de São Paulo identificou 374 portadores de câncer de boca afirmou que a maioria era portadora de câncer em região lingual e/ou assoalho bucal (55,6%) e (20,3%) em região de lábios. Quando presentes, as metástases envolvem principalmente os linfonodos cervicais superiores e mais tardiamente, pulmão, ossos e fígado (BRANDÃO; CAVALHEIRO; SONDERMANN, 2000). Especificamente em relação ao carcinoma

epidermóide de lábio (CEL), vale ressaltar que o mesmo acomete principalmente indivíduos do sexo masculino e o risco de desenvolvê-lo varia com a idade. Seu pico de incidência varia na sexta e sétima década de vida, e é mais comum em lábio inferior que superior. Pereira - Filho et al. (2011) em estudos epidemiológicos de 91 pacientes operados pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, no período de janeiro de 1996 a junho de 2010 concluiu que na amostra analisada 84,61% dos pacientes eram do sexo masculino e a idade média dos pacientes foi de 60,6 anos em 91,11% dos pacientes, o CEC estava localizado no lábio inferior e 58,24% dos tumores eram menores que 2,0 cm.

Segundo o INCA (2008), o câncer de boca inclui os cânceres de lábio e de cavidade oral. Nesse contexto, o câncer de lábio é o tumor mais comum da boca e corresponde a 25% das neoplasias malignas dessa localização (VISSCHER et al., 1998, PEREIRA-FILHO et al., 2011). De acordo com Warnakulasuriya (2009) os maiores índices de acometimento de câncer labial encontram-se na Austrália e Canadá e mais de 50% dos cânceres orais da população australiana são no lábio. Já estatísticas brasileiras mostram que a incidência dessa neoplasia pode variar de 16,4% a 20,3% (DURAZZO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2009). O tipo histológico mais comum de câncer de boca é o carcinoma epidermóide ou espinocelular (cerca de 90 a 95% dos casos), respondendo em média por 40% dos casos dos cânceres de cabeça e pescoço (INCA 2011; VIEIRA et al., 2012).

2.2 Fatores de Riscos

Os fatores predisponentes mais aceitos para a etiologia do CEB são o hábito de fumar tabaco e o de ingerir bebidas alcoólicas. O tabaco, no entanto, representa o principal fator carcinogênico e sua ação é potencializada pela ingestão de álcool (MAGALHÃES;

MAGALHÃES, 2000). Já o câncer de lábio possui uma etiopatogênese peculiar, associada à exposição aos raios ultravioletas tipo B (UVB), ocorrendo, sobretudo, no lábio inferior devido à localização mais acessível para essa radiação (NEVILLE et al., 1998; MAGALHÃES; MAGALHÃES, 2000). A exposição crônica aos raios ultravioletas, principalmente aos raios UVB, são importantes fatores de alterações no DNA, pois apresentam maior poder de penetração devido ao menor comprimento de onda (variando de 280 a 320 nanômetros). Ligações conjugadas em moléculas orgânicas apresentam um comprimento de onda de 200 nanômetros e em moléculas com estrutura em anel esse comprimento aumenta para 320 nanômetros. As bases do DNA, por sua vez, apresentam essas estruturas em anel, o que faz com que absorvam maior quantidade de raios UVB que as demais (PERUZETTO, 2006).

O Estado do Amazonas, especificamente a cidade de Manaus, devido ao clima tropical favorece a exposição da população em geral ao contato com os raios UVB, pois quanto menor é a latitude da cidade, maior é o índice UVB, ou seja, cidades do Norte e Nordeste recebem mais radiação UVB que cidades do Sul e Sudeste (SHIRATORE et al., 2009). Vale ressaltar que os lábios, por apresentarem uma fina camada epitelial, geralmente com ausência da camada de queratina espessa, aliada a menor quantidade de melanina e menor secreção de conteúdo glandular, são mais facilmente afetados pela radiação do que a pele (NICOLAU; BALUS, 1964; KAUGARS et al., 1999).

2.3 Carcinogênese de lábio - Queilite Actínica e Carcinoma Epidermóide de lábio.

Para o estudo da carcinogênese de lábio deve-se considerar não somente os carcinomas epidermóides de lábio (CELS) como também suas lesões precursoras. Em 2005, a Organização Mundial de Saúde, modificou a terminologia das lesões e condições orais pré-malignas e as denominou em lesões com potencial de malignização ou lesões cancerizáveis, dentre elas, a queilite actínica (VAN DER WAAL et al., 2009) que frequentemente antecede o

aparecimento do CEL (CATALDO; DOKU, 1981; MARKOPOULOS et al., 2004). A queilite actínica (QA) é uma lesão análoga à queratose actínica ou solar, que acomete a pele, e da mesma forma que essa, pode sofrer transformação maligna estimada aproximadamente em 10% a 20% dos casos (NICOLAU; BALUS, 1964), apesar de não existirem estudos prospectivos em lesões não tratadas que permitam definir precisamente esse potencial (VAN DE WAAL et al., 2009).

Clinicamente, a queilite actínica apresenta uma forma aguda e outra crônica e estas dependem do tipo de exposição aos raios solares. A primeira apresenta edema e eritema nas formas mais brandas, fissuras e úlceras nas formas mais graves e ocorre quando há exposição excessiva em pouco espaço de tempo e se resolve sem alterações epiteliais (permanentes). Já a forma crônica, considerada irreversível, ocorre em exposições prolongadas e, clinicamente, apresenta em geral rachaduras, descamações, aumento de volume discreto e difuso, e áreas de eritema e/ou áreas esbranquiçadas de espessura e extensões variadas sendo considerada como uma característica marcante dessa lesão a perda do limite mucocutâneo do lábio (CATALDO; DOKU, 1981). É importante ressaltar que os sinais primários dos danos causados pelo sol são sutis e o grau de aparência clínica pode não corresponder com o grau histopatológico nos tecidos epiteliais e conjuntivos (KAUGARS et al., 1999).

As características histopatológicas das QAs apresentam poucas variações, sendo observadas hiperqueratose e acantose, mesmo que áreas adjacentes de atrofia possam estar presentes. Os aspectos mais importantes, porém, são as atipias e alterações arquiteturais que, gradualmente, se instalam no epitélio de superfície, podendo ser encontrados desde os graus mais leves até os mais severos. No tecido conjuntivo adjacente invariavelmente mostra uma mudança basofílica, acelular e amorfa conhecida como elastose solar, advindas possivelmente de um resultado de alterações no colágeno e nas fibras elásticas, podendo apresentar discreto infiltrado inflamatório (NEVILLE, 2004). Lesões que clinicamente são chamadas de QAs,

não raramente são representadas no exame histopatológico por um carcinoma *in situ* ou mesmo invasivo (PISCACIA; ROBINSON; 1987; MAIN; PAVONE, 1994). Acredita-se que o dano das células da camada basal ocorra primariamente, já que a acantose e o aumento da espessura da camada de queratina especificamente estão associados com a progressão das transformações epiteliais. Sendo assim, a exposição solar continuada ou outros fatores etiológicos podem então causar o subsequente aumento de espessura das camadas córnea e espinhosa (KAUGARS et al. 1999). Ainda, Kaugars et al. (1999), consideram a existência de cinco parâmetros morfológicos no diagnóstico da queilite actínica: 1) acantose, 2) modificação basofílica do tecido conjuntivo, 3) presença de infiltrado inflamatório, 4) inflamação perivascular e 5) aumento da espessura da camada de queratina. Segundo os autores, a severidade da displasia epitelial é diretamente proporcional à presença e intensidade desses fatores.

Estados iniciais de CEL podem ser confundidos com queilite actínica, sendo que a displasia epitelial e o carcinoma inicial podem coexistir em lesões de queilites. Em estados avançados da doença são visualizadas úlceras crônicas de bordos endurecidos que não cicatrizam ou que apresentam crescimento verrucoso exofítico. Podendo existir dor associado com exsudato ulcerativo (NEVILLE et al., 2004; OCHSENIUS et al., 2003).

Histopatologicamente, o carcinoma epidermóide de lábio é caracterizado por invasão de cordões e ilhas de células malignas epiteliais. As células do tumor apresentam citoplasma eosinofílico e nucléolo frequentemente aumentado e hipercromáticos como também, um aumento da relação núcleo e citoplasma. Variações No grau de pleomorfismo celular e nuclear são observados, assim como variações de intensidade e diâmetro de pérolas de queratina. Podendo haver queratinização de células individualizada (VIEIRA et al., 2012).

Os aspectos clínicos e o diagnóstico histopatológico baseado na graduação da displasia epitelial representam ainda os principais recursos disponíveis para se estimar o

comportamento de lesões com potencial para transformação maligna, no entanto, apresentam grande subjetividade (GOMES, ARAÚJO E PINTO JR, 2000). De forma usual e simplificada, as displasias costumam ser graduadas utilizando-se os critérios da OMS (2003) levando-se em consideração, sobretudo o grau de queratinização, coesão das células epiteliais e grau de atipia celular, sendo consideradas discretas as descritas no terço inferior do epitélio basal, moderado quando restritas aos dois terços inferiores do epitélio e intensa quando forem restritas aos três terços inferiores do epitélio.

Recentemente, Kujan et al. (2006), propuseram uma nova classificação baseado no critério morfológico usado pela OMS, em 2003 (BARNES et al., 2005). Esses autores propuseram um sistema binário de classificação das lesões em “baixo risco” (até 04 alterações arquiteturais e 05 alterações citológicas e “alto risco” (mais que 04 alterações arquiteturais e 05 alterações citológicas), baseado no número de alterações epiteliais presentes). Essa classificação tem por objetivo agrupar as lesões de forma simplificada visando auxiliar o clínico na tomada de decisão (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação de displasias segundo Kujan (2006).

| Alterações Arquiteturais | Alterações Citológicas |
|---|--|
| Estratificação Celular Irregular | Tamanho do núcleo com variação anormal |
| Perda da polaridade da célula basal | Variação anormal da forma do núcleo |
| Extensão Epitelial em forma de gota | Variação anormal do tamanho da célula |
| Aumento do número de figuras mitóticas | Variação anormal da forma da célula |
| Mitose superficial anormal | Aumento da relação núcleo citoplasma |
| Queratinização prematura em células isoladas | Aumento do tamanho do núcleo |
| Queratinização em pérolas com extensão epitelial. | Figuras mitóticas atípicas |
| | Aumento do número e do tamanho do nucléolo |
| | Hipercromatismo |

Fonte: Kujan et al., 2006.

A classificação histopatológica para graduação do carcinoma epidermóide de boca, podendo-se incluir o lábio, proposta pela OMS, em 2005, baseia-se no grau de diferenciação celular levando-se em consideração, sobretudo o grau de queratinização, coesão das células epiteliais e grau de atipia celular, permitindo o agrupamento da lesão em três categorias. Segundo essa classificação, os CELs são classificados em: a) Bem diferenciados, com predominância de massas / lençóis ou ilhas de células tumorais, altamente queratinizadas, grandes e distintas pontes intercelulares e alta queratinização; b) Moderadamente diferenciados, com menor índice de queratinização, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica mais evidente e com infiltração de células em cordões e ilhas de células neoplásicas e c) Pouco diferenciados com menor índice de queratinização, dispersas dissociações celulares em pequenos grupos de células e/ou células isoladas (BARNES et al., 2005).

Contudo, outras graduações já foram sugeridas para o carcinoma epidermóide a exemplo da graduação proposta por Anneroth (1984) que consiste numa graduação histológica multifatorial do carcinoma epidermóide, fundamentando-se em seis critérios morfológicos representados pela população celular tumoral, como grau de queratinização, pleomorfismo nuclear e número de mitoses, e pela relação tumor/hospedeiro avaliando estágio de invasão, padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário. Cada parâmetro foi graduado em uma escala de um a quatro, e posteriormente obtido o valor da média aritmética. Os casos que obtiveram média entre 1,0 - 2,5 foram considerados de baixo escore de malignidade, e casos com média entre 2,6 – 4,0 de alto escore de malignidade. Conforme observado em trabalhos anteriormente conduzidos por Bryne et al. (1989), o parâmetro estágio de invasão foi omitido por tratar-se de biópsias incisionais em carcinomas escamocelulares de boca.

Apesar de a avaliação microscópica ser relevante para caracterização das lesões, parâmetros mais específicos são necessários, como o estudo dos marcadores biológicos, que

possibilitem um melhor entendimento da carcinogênese, e a identificação de alterações moleculares anteriores ao desenvolvimento do câncer, independente da presença de alterações morfológicas (XAVIER et al.,2009)

2.4 Ciclo celular

O estudo do ciclo celular relacionado ao câncer tem despertado o interesse de numerosos pesquisadores em todo o mundo. O fato chama a atenção, pois no processo de proliferação celular estão envolvidos proteínas e produtos dos oncogenes e genes supressores de tumor que podem explicar a origem do câncer. A utilização de técnicas de imunohistoquímica, usando marcadores biológicos de proliferação celular, permite a compreensão das alterações morfofuncionais que ocorrem no processo de transformação neoplásica. Estas técnicas aliadas também ao estadiamento clínico das neoplasias podem fornecer informações úteis sobre o comportamento biológico e possível prognóstico dessas lesões, além de auxiliar no estabelecimento de terapias (ARISAWA et al., 1999).

Sandal (2002) sugere que o ciclo celular é um processo ordenado que resulta na duplicação e transmissão genética de uma geração celular para outra. É um processo regulado que responde às necessidades de certos tecidos ou célula, existindo um equilíbrio entre a morte celular (apoptose) e proliferação celular (divisão celular), produzindo um estado estável no qual sua desregulação por perda de controle do ciclo celular pode, eventualmente, levar ao desenvolvimento tumoral.

As fases do ciclo celular são as seguintes: Replicação do DNA ocorre durante a fase S (síntese de DNA) e sua segregação na fase M (mitótica), porém em células somáticas as fases S e M são separadas pelas fases “gap” ou intervalo: G1 (pré- sintética) e G2 (pré-mitótica). Na primeira etapa, fase G1, ocorre diversos eventos biológicos responsáveis pelo crescimento

celular e atingindo um determinado tamanho essas células entram na fase S, fase na qual ocorre a síntese de DNA e posteriormente na segunda etapa, fase G2, que corresponde ao intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose, a célula checa se a duplicação está concluída e se prepara para a divisão celular. Depois da divisão, as células voltam a fase G1 e o ciclo se completa. Durante a vida celular ela pode proliferar continuamente, entrar em apoptose (morte celular) ou permanecer quiescente, fase na qual ela sai do ciclo celular e entra em um período fisiológico de repouso (NURSE, 2000).

Os pontos de checagem do ciclo celular, os “checkpoints”, são formas de controlar a ordem e o tempo das transições dos eventos críticos como a replicação do DNA e a segregação do cromossomo que devem ser realizadas na mais alta fidelidade. Essa checagem é responsável pelo reparo do dano ocorrido no ciclo, tendo envolvimento de genes específicos. A perda deste “checkpoint” resulta na instabilidade genômica e tem sido implicada na evolução de uma célula normal para uma célula cancerosa (SANDAL, 2002).

2.4.1 Controle do Ciclo Celular

Para que exista preservação do ambiente e da vida celular, o ciclo celular é controlado por proteínas codificadas por genes os quais atuam nos diversos estágios existentes do ciclo controlando a proliferação descontrolada das células e regulando a passagem de uma fase a outra por mecanismos de retroalimentação. Uma classe dessas proteínas reguladoras do ciclo são as CDK (quinases ou cinases dependentes de ciclina) consideradas integrantes primordiais do sistema de controle do ciclo celular essas, exercem suas ações, adicionando grupos fosfatos a outras moléculas em um processo chamado de fosforilação, porém elas precisam ser ativadas pelas ciclinas. As ciclinas recebem esse nome por atuarem de forma cíclica durante a divisão celular, ora sintetizada, ora degradada, as sintetizadas ligam-se as CDKs ativando-as

e, por meio da fosforilação de outras proteínas, induzem a célula a passar de uma fase a outra no ciclo celular. Ao término, as ciclinas são degradadas desativando as CDKs e um novo sinal é transmitido à célula, agora para a finalização de alguma determinada fase do ciclo celular (BERNARDS 2009).

Dentre as ciclinas da fase G1, a ciclina D liga-se às CDK 4 e 6 e o complexo por elas formado liga-se à proteína do retinoblastoma (pRB), provocando o início de sua fosforilação e consequente inativação. A pRB (uma fosfoproteína supressora tumoral de 110 kDa), existente na maioria das células dos tecidos humanos tem como função captar o fator de transcrição celular E2F, inativando-o. O E2F quando está livre (não ligada ao pRB) estimula a célula a sair da fase G1 e entrar na fase S do ciclo celular. Quando a pRB está hipofosforilada, ou seja, apresentando número reduzido de radicais fosfato acoplados, ela liga-se avidamente com o E2F, fazendo com que ele não fique livre para estimulação da síntese de DNA. (KHLEIK et al., 1996; BERNARDS 2009)

Quando a pRB sofre ação, por acoplamento, do complexo ciclina-D/CDK4-6, começa a receber radicais fosfato e esta fosforilação inicial provoca a liberação do fator E2F, que poderá então desempenhar seu papel no ciclo celular. Essa fosforilação do pRB é controlado por um mecanismo de retroalimentação. Um desses mecanismos ocorre por meio de proteínas inibidoras das CDK (ou INK). Dentre as INK, podemos encontrar a proteína p16^{INK4a} a qual é codificada por um gene supressor tumoral e recebe esta denominação por possuir 16 kDa e massa atômica e inibir a quinase dependente da ciclina 4 (como também a 6). Conseqüentemente, se inibidas, não haverá fosforilação do pRB e ele vai se ligar ao fator de transcrição impedindo que a célula entre na fase S, mantendo o ciclo celular em repouso (KHLEIF et al., 1996)

Nas células normais, ocorrem variações do p16, para que a célula continue seu processo. Em vista disso, No término da síntese, a pRB fosforilado e o E2F estão com suas

expressões aumentadas, o que indica na estimulação dos genes produtores da proteína p16^{INK4a}, esta, produzida, inibe a ação das CDK4 e CDK6 fazendo com que a pRB fique hipofosforilada e capte o E2F, o qual vai deixar de estar superexpressado no ambiente celular e deixa de estimular a passagem da fase G1 para S. Com o acúmulo da pRB hipofosforilada ocorrerá a diminuição dos genes produtores de p16 e a proteína então diminui sua expressão fazendo com que ocorra a liberação da ciclina/CDK sobre a união pRB- E2F, voltando a mesma a ser fosforilada e liberação do E2F e o ciclo novamente estimulado (KHLEIF et al., 1996).

A ocorrência de danos no DNA desencadeia um processo de apoptose, a morte programada da célula. Neste processo de suicídio celular estão envolvidas enzimas designadas caspases. A proteína p53 ativa o mecanismo de apoptose ativando a transcrição de um gene designado Bax. A forma normal da proteína Bax é um heterodímero que está em equilíbrio com outra proteína designada Bcl-2, a qual é um inibidor da apoptose. Quando a p53 ativa a transcrição do gene Bax o balanço existe em favor da Bax em detrimento da Bcl-2 e o ocorre a apoptose. A ativação de oncogenes, genes associados ao aparecimento de tumores, pode provocar um incremento na concentração da forma ativa (fosforilada) de Bcl-2o que impede a apoptose e origina células imortais que se dividem de forma indefinida (KHLEIF et al., 1996).

2.4.2 Bcl-2

Estímulos internos, como dano genético irreparável, concentrações altas de Ca⁺, ou estresse oxidativo severo, levam a ativação de fatores citoplasmáticos pró-apoptóticos, destes, os mais estudados pertencem à família do Bcl-2, compreendendo uma família atípica de proteínas regulatórias, algumas das quais promovem apoptose (por exemplo, Bad, Bid e Bax) e

outras que previnem a apoptose celular (exemplo Bcl-x, Bcl-w e a própria Bcl-2) (KARP 2003).

Bcl-2 foi identificada pela primeira vez em linfomas B não-Hodkin (Tsujimoto et al., 1984) e atua promovendo a carcinogênese prevenindo a morte e aumentando a taxa de divisão celular, mantendo a célula na fase G0/G1 do ciclo celular. O mecanismo de apoptose induzido pela radiação UV é bastante complexo e envolve várias vias, assim como as células que são atingidas apresentam níveis altos de Bax apresentam da mesma forma níveis baixos de Bcl-2, o que provocaria a formação de dímeros que levariam a Bcl-2 a ter efeito pró-apoptótico, isso se comprova com estudos que demonstram diminuição da expressão do Bcl-2 quando comparados a tecidos de lábio normal (MARTINEZ et al., 2005).

As alterações citoplasmáticas da apoptose são controladas diretamente pela proteína Bcl-2 que regula a concentração de Ca^{++} livre no citosol, inibindo a liberação deste pelo retículo endoplasmático e então, impedindo assim a apoptose. A literatura se refere à expressão da Bcl-2 como exclusivamente citoplasmática por normalmente apresentar-se no lado externo da membrana mitocondrial, no envelope nuclear e no retículo endoplasmático das células (LORO et al., 2003). Possivelmente, a Bcl-2 atua também de outras formas no intuito de prevenir a apoptose, além da liberação do citocromo c pela mitocôndria. Quando há um estímulo para a apoptose da célula, a liberação do citocromo c é induzida pela bax que por sua vez é ativada pela proteína p53 (GERSKE; GERSCHENSON, 2001).

Em epitélios com a proliferação normal, a proteína Bcl-2 é encontrada em células tronco (indiferenciadas) como as da camada basal, onde as previne de morrer, a expressão nas camadas suprabasais de lesões cancerizáveis, sugerem um potencial de transformação maligna alta (TANDA et al., 2000)

Yao et al. (1999) estudaram a correlação das proteínas Bcl-2 e p53 em 52 carcinomas de células escamosas da língua e observaram que houve expressão respectivamente 50% e

60% dos casos e a associação da Bcl-2 com o grau de diferenciação tumoral. Kannan et al. (1998) relataram que a presença de altos níveis de Bcl-2 aumenta a sobrevivência das células podendo facilitar a mutação de outros genes supressores tumorais e oncogenes, resultando em uma expansão clonal atípica.

Perea et al. (2004), na Universidade de Catambria, na Espanha, Estudou a expressão imunohistoquímica das proteínas cerb-B2, p53, ki67 e CD44 em carcinomas epidermóides de lábio diagnosticado e tratado ao longo de 20 anos (1975 – 1995), com amostra de 76 casos para Bcl-2, considerando positivas células tumorais marcadas, infiltrado inflamatório e queratina de glóbulos paraqueratósicos teve como resultado 73 casos negativos e apenas 03 positivos.

Balassiano (2004) realizou um estudo comparativo das proteínas Bcl-2, p53, caspase3 e ki67 em hiperplasias fibrosas inflamatórias, queilites actínicas e carcinoma epidermóide, de lábio inferior, obtendo 20 amostras de cada grupo, concluiu que a inibição da morte celular programada revelada possivelmente pela expressão do Bcl-2 mostrou-se maior no grupo dos carcinomas dado ao desequilíbrio entre apoptose e proliferação celular como também no grupo de queilite sem displasia pelo fato de nestes já estivessem ocorrendo alterações celulares morfologicamente imperceptíveis.

Costa (2010) em um universo de 40 casos incluindo queilites actínicas e carcinomas epidermóides de lábio observou que a proteína Bcl-2 apresentava expressão apenas citoplasmática e um grande número de casos apresentava-se negativo para essa proteína (26/60). Em nenhum caso foi obtido marcação em mais que 50% de células.

2.4.3 p16^{INK4a}

A proteína p16^{INK4a} é um produto do gene CDKN2A e inibidora das CDK4 e CDK6, que, em condições normais, impede a fosforilação da pRb e a liberação do fator de transcrição celular E2F. As células, sob estímulo da p16^{INK4a}, permanecem na fase G1 do ciclo celular e não seguem para a fase de síntese de DNA (KHLEIF et al., 1996).

A expressão aberrante da ciclina D1 também está relacionada à deleção do gene p16 (NAZAMIE et al., 2002; UZAWA et al., 2007), cuja proteína funciona como inibidora do complexo ciclina e CDK. Neste complexo, os objetos de estudo são as proteínas quinases, conhecidas como quinases dependentes de ciclina (CDKs), assim como seus ligantes, como, por exemplo, o p16^{INK4A} e os complexos formados por elas. O mecanismo do processo inicia quando a ciclina D1 é ativada pelas ciclinas dependentes de quinase (CDK4) e (CDK6), as quais levam a fosforilação do pRB, liberando então o E2F-1 (fator de transcrição) para a fase G1, favorecendo a transcrição de genes essenciais para a progressão celular para a fase S. Pelo contrário, a proteína p16^{INK4a} exerce a função de supressor tumoral pela união ao complexo ciclina D1 CDK4-CDK6, prevenindo a fosforilação do pRB e resultando no sequestro da fase G1. A fosforilação do pRB é regulada positivamente pela ciclina D1 e negativamente pela p16 (Figura 1). A ciclina D1-p16^{INK4a}-pRB frequentemente é desregulada em carcinomas de células escamosas. Várias aberrações nesta via celular são observadas em mais de 80% dos carcinomas. Portanto, estas moléculas reguladoras do ciclo celular, como a ciclina D1 e p16 apresentam um potencial extraordinário na análise de prognóstico (USAWA et al., 2007), podendo a perda funcional do gene p16 estar associada também ao desenvolvimento de uma variedade de neoplasias malignas (GUERRA et al., 2005; UZAWA et al., 2007). A inativação da proteína p16 pode estar relacionada diretamente com os eventos neoplásicos devido a diversas causas, sendo uma delas através da metilação da região promotora deste gene. As evidências sugerem que a expressão aumentada de DNMT3b, enzima envolvida no evento de

metilação do DNA, possa conduzir à inativação do gene p16 CDKN2A nos fenômenos carcinogênicos (KATO et al.,2006).

Vairaktaris et al. (2007) estudaram a perda da expressão do p16 em estágios iniciais da carcinogênese oral, em uma amostra de 37 ratos tratados com carcinógenos, mostraram o aumento da proteína p16 em hiperplasias, nítido decréscimo em displasias e nos estados subsequentes da carcinogênese oral e concluiu que a inativação do p16 ocorre nos estágios iniciais de displasias na mucosa e considerou a proteína como um marcador útil para prognóstico da progressão do câncer oral.

Klaes et al. (2001) analisaram a superexpressão do p16^{INK4a} em células com displasias e neoplasias do cérvix uterino, considerando tanto marcação citoplasmática como nuclear sugeriram que essa proteína é de fato superexpressada em células transformadas de tipos de HPV.

Mortier et al. (2002) estudaram a progressão de queratose actínica para carcinoma de células escamosas da pele, em um grupo de 48 participantes (28 homens e 20 mulheres), usando somente 10 casos de carcinoma de pele e 12 de queratose actínica para realização da imunohistoquímica. Neste estudo investigou-se a integridade da região 9p21 contendo o gene CDKN2A e correlatos com a expressão. Foi determinado que, ao contrário do carcinoma epidermóide de pele, as queratose actínicas são lesões relativamente livres de alterações genéticas na região 9p21. Por conseguinte, a expressão p16^{INK4a}, ausente na maioria dos carcinomas de pele, não é afetada em células de queratose actínica. Esses autores sugeriram que na progressão de queratose actínica para carcinoma epidermóide de pele possa ter ocorrido um disparo molecular, envolvendo já a inativação do p16^{INK4a} por queratinócitos de queratose actínica transportando a p53 mutada. Concluíram que seus dados fornecem fortes evidências de que essa progressão molecular envolve alterações que levam à inativação p16^{INK4a}, pela também alteração do gene que codifica essa proteína (CDKN2A).

Queiroz et al. (2009) estudando um grupo de 32 casos de epitélio escamoso normal, 30 casos de carcinoma de células escamosas e 34 casos de carcinoma de células escamosas da cavidade oral observaram que p16^{INK4A} obteve imunopositividade focal em 100% para os grupo controle e papiloma escamoso e 94% para o grupo carcinoma de células escamosas.

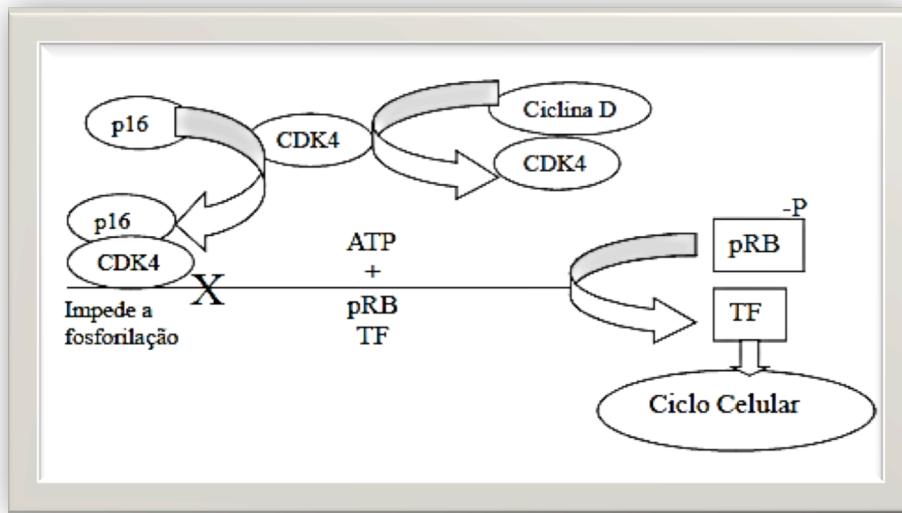


Figura 1. Papel do p16 e da CDK4 na regulação do ciclo celular. A proteína p16 se liga a CDK4 e forma o complexo p16-CDK4, impedindo a fosforilação do pRB. O pRB, hipofosforilado, mantém-se supressor de tumor. Por outro lado, no caso de disfunção do p16, a CDK4 pode ligar-se à ciclina D e formar o complexo CDK4-ciclina D. Este complexo promove a fosforilação do pRB e libera o fator de transcrição (TF), o qual acelera o ciclo celular. Fonte (GUERRA et al., 2005): adaptado Chen et al., 1999.

2.4.4 Ciclina D1

Ciclina D1, uma proteína de 45kD (kilo Dalton) codificada pelo gene (CCND1) localizado no cromossomo 11q13 é um regulador positivo do ciclo celular que codifica uma proteína nuclear que forma complexos ciclina dependentes de quinases 4 e 6, as quais fosforilam e inativam o retinoblastoma (pRB). A inativação do pRB permite a progressão da fase G1 para S (PESTELL et al., 1999).

Apesar de existirem diversos estudos envolvendo marcadores do ciclo celular durante o processo de carcinogênese intra-oral, poucos abordam esse processo na região de lábio. Um dos principais marcadores estudados na carcinogênese oral é a ciclina D1, a qual fisiologicamente está presente na fase G1 do ciclo celular e encontra-se amplamente presente em células epiteliais e fibroblastos. Esta é um regulador positivo da progressão da fase G1

para S e vários experimentos mostram que a superexpressão da ciclina D1 leva ao encurtamento da fase G1, causando um aumento da proliferação celular (IZZO et al., 2003). Estudos mostram que a superexpressão da ciclina D1 está relacionada a estágios precoces da carcinogênese e a um pior prognóstico em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (MICHALIDES et al., 1997; IZZO et al., 2003). A forte expressão da ciclina D1 em carcinomas epidermóides bucais de alto grau sugere que esta proteína está associada à proliferação celular nessas lesões (NEVES et al., 2004). Ferrazzo (2008) sugere que esta proteína está associada à maior proliferação celular e agressividade principalmente quando comparado ao adenocarcinoma de baixo grau de glândulas salivares.

Maahs et al (2007) concluíram que a perda da diferenciação em carcinomas epidermóide bucais e carcinomas verrucosos estão relacionados com o aumento da expressão da proteína ciclina D1. Ainda Maahs et al. (2007) estudaram a expressão da ciclina D1 e verificaram sua associação com a metástase em 45 pacientes com câncer de boca e concluíram que a expressão da ciclina D1 parece ser independente das características clínicas e histológicas do carcinoma epidermóide. Saawarn et al. (2012) utilizando 40 casos de carcinoma epidermóides orais observaram expressão da Ciclina D1 em 48% (n=18) casos sendo maior sua expressão nos bem diferenciados seguidos de moderadamente e pouco diferenciado de boca.

Nesse contexto, o estudo do ciclo celular relacionado ao câncer tem despertado o interesse de numerosos pesquisadores em todo o mundo. Apesar de existirem diversos estudos envolvendo marcadores do ciclo celular, poucos abordam esse processo na região de lábio aliado a carência de estudos relacionados a proteínas do ciclo celular no carcinoma epidermóide labial. Com base nesses aspectos propusemo-nos avaliar a expressão imunohistoquímica do Bcl-2, p16^{INK4a} e ciclina D1 em carcinomas epidermóides de lábio, tendo como hipótese um possível aumento na expressão do Bcl-2 e Ciclina D1

simultaneamente com a diminuição da expressão do p16^{INK4a} nos carcinomas epidermóides de lábio, objeto deste estudo, com base na literatura científica acerca da expressão dessas proteínas na carcinogênese de maneira geral.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão imunohistoquímica do Bcl-2, p16^{INK4A} e ciclina D1 em carcinomas epidermóides de lábio.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Classificar os carcinomas epidermóides de lábio de acordo com a graduação histológica de malignidade.

3.2.2 Caracterizar os diferentes padrões arquiteturais do carcinoma epidermóides de lábio.

3.2.3 Avaliar a expressão tecidual do Bcl-2, p16^{INK4a} e ciclina D1 em carcinomas epidermóides de lábio de acordo com a extensão de células marcadas (percentual de marcação), graduação histológica e diferentes padrões arquiteturais, com vistas à descoberta de um possível marcador biológico.

3.2.4 Comparar entre si a expressão tecidual do Bcl-2, p16^{INK4a} e ciclina D1 em carcinomas epidermóides de lábio, queilites actínicas e lesões reativas do lábio inferior (LRs).

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo descritivo, retrospectivo e transversal visando avaliar a expressão imunohistoquímica das proteínas do ciclo celular Bcl-2, p16^{INK4a} e ciclina D1 em carcinomas epidermóides de lábio de acordo com as suas diferentes áreas histológicas, além de comparar a expressão dessas proteínas em queilites actínicas e lesões reativas do lábio inferior.

4.2 Universo de Estudo

4.2.1 População de Estudo

Pacientes portadores de carcinoma epidermóide de lábio residentes no estado do Amazonas, além de pacientes portadores de queilites actínicas e lesões reativas do lábio inferior.

4.2.2 Participantes

O estudo referiu-se a um censo dos casos encontrados de material parafinado, no período compreendido entre janeiro de 2000 e junho de 2012, provenientes de pacientes portadores de carcinomas epidermóides de lábio (CEL), queilites actínicas (QAs) e lesões reativas (LR), arquivados no Laboratório de Anatomia Patológica, pertencente ao Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON), hospital referência de diagnóstico e tratamento de câncer no Amazonas.

Informações sobre raça, sexo, idade, cor, profissão, hábitos dos pacientes, localização da lesão foram obtidos através da análise das requisições dos exames histopatológicos e

prontuários. Em relação à idade, os pacientes foram separados em dois grupos: Grupo 1: de 40 a 60 anos e Grupo 2: acima de 60 anos.

4.2.3. Critérios de Elegibilidade

Critérios de Inclusão

-Pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma epidermóide de lábio e queilite actínica.

- Pacientes acima de 40 anos de idade

Critérios de exclusão

- Material insuficiente para análise

4.3 Informações Éticas

O trabalho foi aprovado pelo Comité de Ética em pesquisa com seres humanos da UFAM sob o n. CAAE-0065.0.115.252-11.

4.4 Procedimentos

Inicialmente foram coletadas as lâminas dos arquivos de anatomia patológicas do DPML da UFAM e da FCECON e em seguida foram selecionadas as lâminas para cada caso específico, sendo necessária a repetição da Hematoxilina & Eosina (HE) em alguns casos para melhor análise.

Foram realizados, em cada bloco, cortes histológicos de 4µm em lâminas silanizadas (3-aminopropyltriethoxy-silano a 10% em etanol absoluto) preparadas na (FMT-HVD). Optou-se pela técnica de cortes seriados para que não houvesse muitas variações nas distâncias entre as áreas a serem analisadas em cada lâmina. Foram realizados 08 cortes de cada bloco enumerados da seguinte maneira: 1º e 2º para realização da primeira reação com

anticorpo Bcl-2 e sua respectiva duplicata; 3º e 4º lâmina para reação da primeira reação com o anticorpo p16 e sua respectiva duplicata; 5º e 6º para reação com o anticorpo ciclina D1 e sua respectiva duplicata; 7º e 8º para casos de repetição.

As reações imunoistoquímicas do anticorpo anti-Bcl-2 e anti-p16 foram realizadas na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-HVD). As reações com o anticorpo ciclina D1 foram realizadas no Anticorpos Laboratório localizado no Rio de Janeiro, na cidade de Niterói.

As reações imunoistoquímicas para marcação das proteínas das ciclinas Bcl-2, p16^{INK4a} e CD1, foram realizadas a partir do método do polímero marcado, sendo utilizados anticorpos monoclonais (Quadro 2).

Quadro 2: Anticorpos utilizados no trabalho e suas especificações.

| Anticorpo | Clone | Código de catálogo | Fornecedor |
|--------------------|--------------|--------------------|-------------------------------|
| Oncoproteína Bcl-2 | Bcl-2/100/D5 | NCL-Bcl-2 | Novocastra Laboratories Ltda. |
| Proteína P16 | 6H12 | NCL-P16-432 | Novocastra Laboratories Ltda. |
| Anti Ciclina D1 | SP4 | 241R-14 | Rocklin CA 95677 USA |

Inicialmente, os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol de 10 minutos cada. Em seguida os cortes foram reidratados em banhos descendentes de etanol absoluto por três vezes etanol 95% e 85% durante três minutos cada. Foi utilizado PBS durante 05 minutos para remoção de pigmentos formólicos. Após lavagem em água corrente seguida de dois banhos de água destilada de cinco minutos cada um os se procedeu a etapa de recuperação antigênica que consistiu em mergulhar as lâminas em solução de citrato pH= 6,0 durante 10 minutos em forno micro-ondas com potência média de 10 graus célsius, esfriar durante 20 minutos e em seguida três banhos de PBS de cinco minutos cada.

Após os banhos, para inativação da peroxidase endógena residual foi realizada um banho de 20 minutos em solução de peróxido de hidrogênio + metanol (1:1), em seguida três banhos de PBS. Em seguida os cortes foram incubados em câmara úmida diluídos com o anticorpos primários diluídos em solução de albumina bovina a 1%, contendo azida sódica a 0,1% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany), sob diluição de 1:300, durante 18 horas a 4°C.

Após a incubação foi realizado três banhos de PBS por cinco minutos cada, em seguida foi utilizado o anticorpo secundário (Marca: Novocastra, Novolink, lote: 715902) 30 minutos, novamente três banhos de PBS por cinco minutos cada. Logo após foi utilizado anticorpo terciário (Marca: Novocastra, Novolink, lote: 7161) por 30 minutos, em seguida três banhos de PBS por cinco minutos cada. Logo após os banhos foi utilizados DAB (Bcl-2 e p16 – Marca: Easypath, lote: 1201 -Ciclina D1 – Marca: Cell Marque – Rocklin, CA 95677 USA) de 05 a 10 minutos e em seguida lavagem em água corrente para remoção de excessos, logo após Hematoxilina de Mayer por 10 minutos seguidos de banhos em água corrente, passagem por álcool absoluto e inserção de lamínula (Enthelan) – para utilização em microscópio de luz. O controle negativo foi obtido através da supressão do anticorpo primário durante a realização da reação, ressaltando que na FMTAM na mesma lâmina da reação foi feito o controle negativo, caso haja dois ou mais cortes do mesmo tecido (Figura 2).

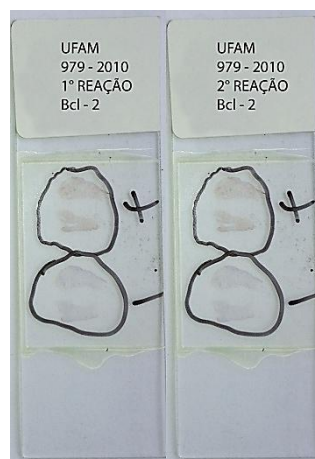


Figura 2. Lâminas para imunistoquímica mostrando controle positivo e negativo.

4.5 Análise das amostras

As análises histológicas de cada lesão foram feitas por pelo menos dois patologistas do DPML, através de um microscópio óptico, da marca Olympus.

4.5.1 Análise descritiva do HE

As lâminas histológicas selecionadas de CELs foram classificadas segundo a OMS (2005), e as QAs classificadas segundo a OMS (2003) e segundo Kujan (2006).

Cada caso de CEL foi avaliado de acordo com a presença de padrões arquiteturais tais como lençóis, massas e ilhas, cordões, pérolas de queratina, ilhotas e células isoladas (LIBÓRIO et al., 2011) (apêndice 1).

4.5.2 Análise descritiva e semiquantitativa da imunoistoquímica

Os cortes submetidos à técnica de imunoistoquímica foram examinados ao microscópio de luz nos aumentos de 100x e 200x, porém, há fotos no aumento de 400x somente para melhor demonstração de evidências. A expressão das proteínas foi considerada quando houve marcação com coloração acastanhada tanto citoplasmática quanto de membrana citoplasmática para o Bcl-2, citoplasmática para p16^{INK4a} e nuclear para ciclina D1.

Foi utilizado um controle positivo para cada anticorpo de acordo com os controles utilizados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMT-HVD) como também se considerou a marcação do controle endógeno da reação para que a mesma fosse considerada legítima e passível de análise. Para o anticorpo anti-Bcl-2, a amígdala foi utilizada como controle positivo e o infiltrado inflamatório como controle endógeno da reação. Para o anti-p16, o controle positivo foi o carcinoma de células do pênis e a queratina, o controle

endógeno. Já para o anticorpo anti – ciclina D1, o controle positivo foi o linfonodo cervical compatível com células do manto, não apresentando controle endógeno.

Para os casos em que nenhum marcador foi positivo, foi utilizado um Pan de citoqueratinas AE1/AE3, a fim de avaliar a viabilidade do material utilizado. Esse pan é uma mistura de dois anticorpos monoclonais (AE1 e AE3) obtidos contra queratinas epidérmicas humanas. AE1 reconhece a maioria das queratinas ácidas (tipo I). AE3 reconhece todas as queratinas básicas conhecidas. A combinação tem amplo espectro de positividade para todos os tipos de epitélios e suas neoplasias. Foi considerada a submissão de tecidos que não marcaram controle endógeno pelo fato de alguns blocos terem sido encontrados em más condições, expostos a altas temperaturas, comprometendo suas ligações com os anticorpos em questão, o que tornaria a amostra inviável.

O resultado da imunistoquímica foi avaliado de acordo com a imunexpressão de cada uma das três proteínas nas áreas histológicas encontradas em cada caso de CEL (lençóis, massas e ilhas, cordões, pérolas de queratina, ilhotas e células isoladas), o que poderia evidenciar diferenças no grau de expressão de acordo com a diferenciação celular (LIBÓRIO et al., 2011). Deve-se considerar que a ênfase foi dada nas diferentes áreas histológicas do CEL, que podem estar presentes inclusive em diferentes graduações histológicas. Para os casos de queilites actínicas e lesões reativas do lábio foram analisadas a imunexpressão considerando-se as localizações do epitélio, ou seja, camada basal, suprabasal, superficial e ainda em todas as camadas. Foram utilizadas 06 amostras de lesões reativas localizadas em mucosa labial inferior já que esta lesão não possui alterações genéticas compatíveis com malignidade, servindo, portanto, como um controle de tecido normal.

É importante salientar que um caso de queilite actínica, dois casos de carcinoma e todos os casos de fibroma para a proteína p16 foram realizados com p16 Ki67CINtec PLUS Kit, sendo analisada somente a expressão citoplasmática a qual, de acordo com a técnica

empregada utilizam-se dois cromógenos, o DAB (Diaminobenzidina) e o AEC (3-Amino-9-etilcarbazo). O primeiro revela a reação conferindo coloração acastanhada para o anticorpo p16^{INK4a} (citoplasmático) e o segundo coloração avermelhada para o anticorpo ki67 (nuclear). Porém, na utilização do kit, suprimimos o AEC e as expressões, quando visualizada, apresentavam-se de cor completamente acastanhada.

A expressão imunohistoquímica do anticorpo anti-Bcl-2, anti-p16 e anti-ciclina D1 em QA e CEs de lábio foram avaliadas semiquantitativamente, de acordo com Silveira (2006). Todas as amostras foram graduadas em uma escada de intensidade de 0 a 4 cruces. Esta escala de positividade varia de acordo com a porcentagem de células marcadas pela imunohistoquímica, sendo ausente quando nenhuma célula for marcada; (+), até 25% de células marcadas; (++) , entre 26% e 50% de células marcadas; (+++) , entre 51% e 75% das células marcadas; (++++), mais de 75% de células.

As reações foram analisadas como positivas ou negativas, marcação nuclear, citoplasmática ou de membrana, porcentagem (análise semiquantitativa) e padrão celular. Para os 03 anticorpos analisados foram observados e anotados a distribuição da coloração referente às proteínas. No grupo de carcinomas epidermóides de lábio, foram observadas e anotadas a distribuição de marcação em lençóis, massas e ilhas, cordões, pérolas de queratina e células isoladas, sendo importante relatar que em um caso somente podemos obter mais de uma área histológica positiva (Tabela 1). Nas amostras de queilite actínica e lesões reativas do lábio foram observadas marcações no epitélio de revestimento (Tabela 2).

Tabela 1: Análise descritiva e semiquantitativa dos carcinomas epidermóides de lábio.

| CLASS. | GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA | | STATUS DE MARCAÇÃO | % | PADRÃO | LENCÓI S/ MASSAS e ILHAS | CORDÕES | PÉROLAS DE QUERATINA | ILHOTAS | CÉLULAS ISOLADAS |
|--------|-----------------------|-------|--------------------|---|--------|--------------------------|---------|----------------------|---------|------------------|
| | OMS | Kujan | | | | | | | | |
| CEL | | | | | | | | | | |

Legenda:

Gradação Histológica: BD (Bem diferenciada); MD (Moderadamente diferenciada); PD (Pouco diferenciada)

Status de marcação: P: Positivo (Houve marcação); N: Negativo (Não houve marcação)

% = Percentual de Marcação: (+) Até 25% / (++) entre 26% e 50% de células marcadas / (+++) Entre 51% e 75% de células marcadas/ (++++) mais de 75%

Padrão: Nuclear (N) ; Citoplasmática (C); Membrana Plasmática (M)

Tabela 2: Análise descritiva semiquantitativa das queilites actínicas.

| CLASS | GRADUAÇÃO | | STATUS DE MARCAÇÃO | % | PADRÃO | BASAL | SUPRABASAL | SUPERFICIAL | TODAS |
|-------|-----------|-------|--------------------|---|--------|-------|------------|-------------|-------|
| | OMS | Kujan | | | | | | | |
| QA | | | | | | | | | |

Legenda:

Gradação: BD (Bem diferenciada); MD (Moderadamente diferenciada); PD (Pouco diferenciada)

Status de marcação: P: Positivo (Houve marcação); N: Negativo (Não houve marcação)

% = Percentual de Marcação: (+) Até 25% / (++) entre 26% e 50% de células marcadas / (+++) Entre 51% e 75% de células marcadas/ (++++) mais de 75%

Padrão: Nuclear (N); Citoplasmática (C); Membrana Plasmática (MP).

4.6 Análise estatística da IHQ

Os estudos descritivos iniciais foram realizados através da distribuição de frequências em tabelas e das medidas de posição (média, mediana e etc.) e de variabilidade.

Para a análise das variáveis qualitativas (Sexo, Gradação Histológica, Status de Marcação, Percentual de Marcação e etc.) foram utilizados o Teste Exato de Fisher para analisar diferença entre as proporções, e entre as comparações da média das idades entre os Status de Marcação (variáveis quantitativas), foi realizado o Teste T de Student na comparação de mais de duas médias.

Os softwares estatísticos utilizados foram o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versão 16.0 e programa R 2.11.

Para todas as análises, foi fixado um nível de significância alpha de 0,05 e um coeficiente de confiança de 95%.

5. RESULTADOS

5.1 Dados epidemiológicos e caracterização das amostras

De 23 amostras de carcinomas epidermóides de lábio (CEL) encontradas, seis foram excluídas, em função da qualidade e/ou ausência dos blocos. Das 17 amostras de CEL selecionadas 53% (n=9) foram oriundas de pacientes do sexo feminino e 47% (n=8) do sexo masculino. O lábio inferior foi acometido em 67% (n= 12) dos casos em relação ao superior (33%, n=5) (Gráfico 1). A raça predominante foi parda 65% (n=12), e a idade dos pacientes variou de 40 a 86 anos (média de 65,47 anos), estando a maioria (64,7%, n= 11) acima dos 60 anos de idade (Gráfico 2).

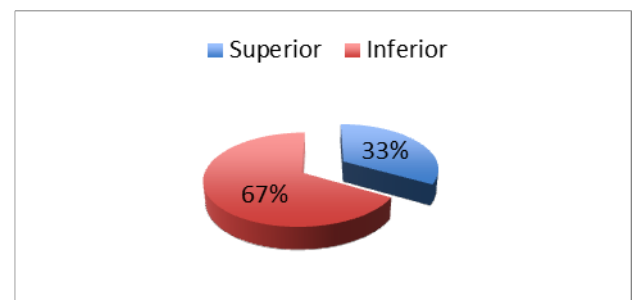
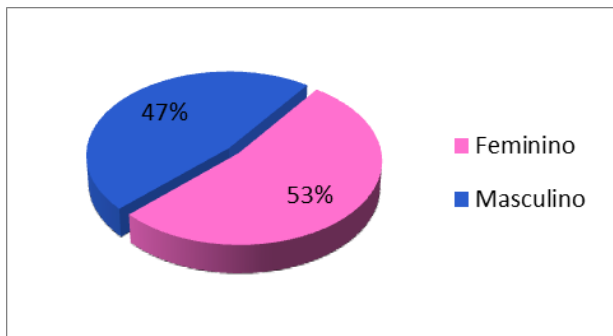


Gráfico 1: Distribuição do câncer labial segundo o sexo e raça

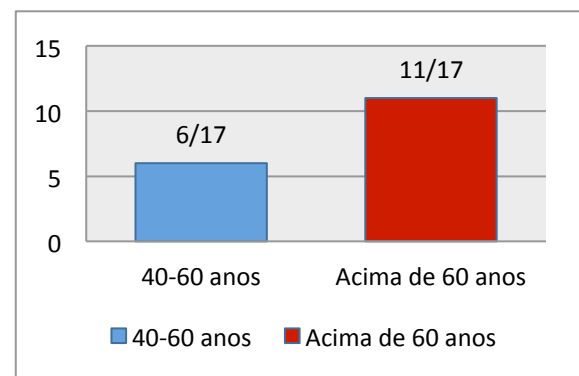
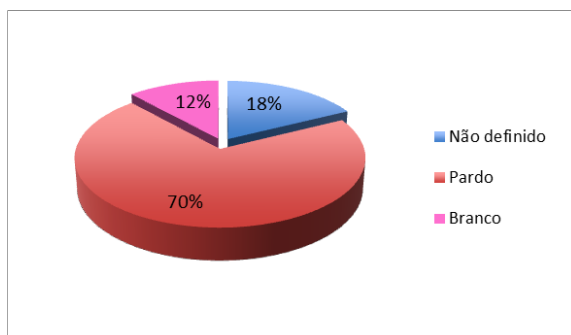


Gráfico 2: Distribuição quanto a localização da lesão e segundo a faixa etária.

Em relação à análise morfológica, das 17 amostras selecionadas de CEL, 64,70% (n=11) foram classificadas como bem diferenciadas (BD), 29,42% (n=5) como moderadamente diferenciadas (MD) e 5,88% (n=1) como pouco diferenciadas (PD) (Gráfico 3). Quanto ao tipo de área histológica foi identificada uma maior quantidade de lençóis, massas e ilhas (100%, n=17) e em menor quantidade de células isoladas (58,82%, n=10) (Gráfico 4). Vale ressaltar que áreas histológicas semelhantes foram encontradas em diferentes graduações histológicas (BD, MD e PD). As informações detalhadas em relação a cada amostra de CEL estão contidas no apêndice 1.

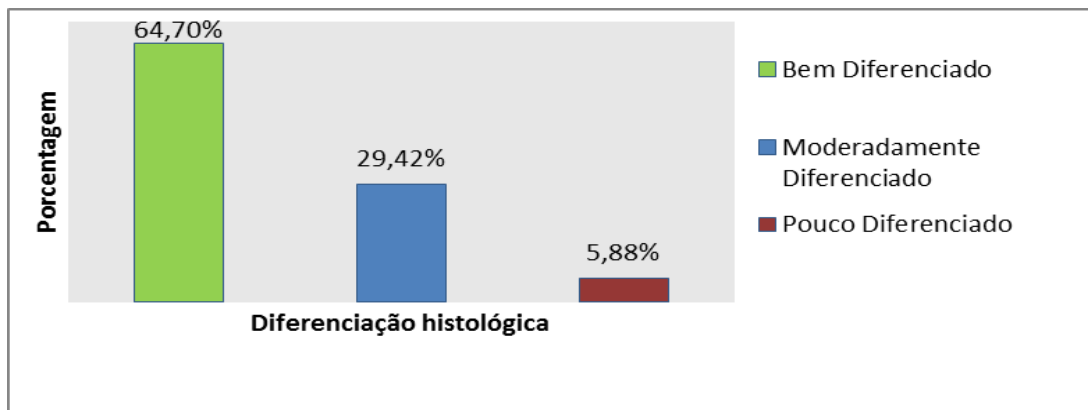


Gráfico 3: Distribuição da graduação histológica nas amostras de carcinoma epidermóide de lábio

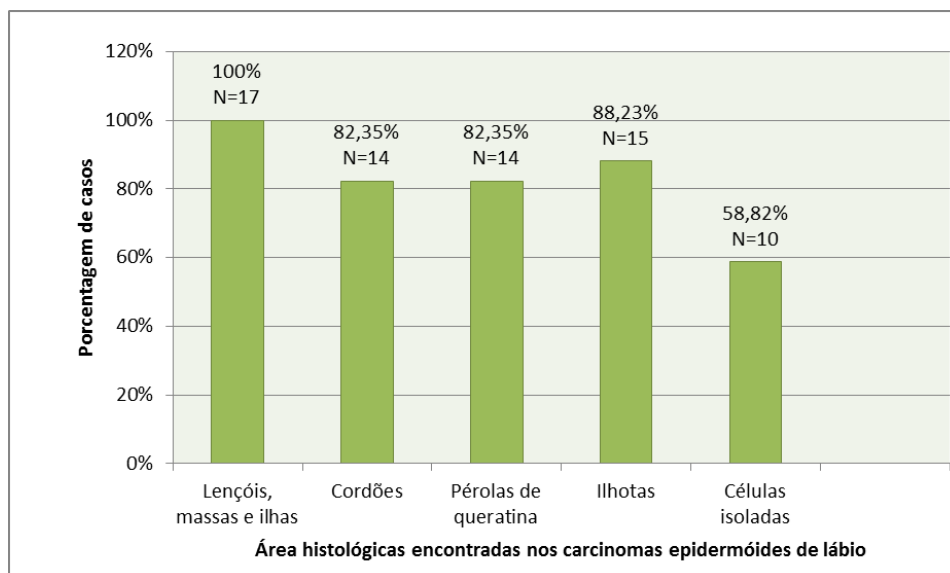


Gráfico 4: Distribuição de áreas histológicas encontradas nos carcinomas epidermóides de lábio.

Das sete amostras de queilites actínicas (QA) encontradas, três foram excluídas em função da qualidade do material histológico. Das quatro amostras selecionadas, metade era proveniente de pacientes do sexo feminino (50% n=2) e metade do sexo masculino (50% n=2). Em nenhum dos casos houve descrição de raça e a idade dos pacientes variou de 49 a 61 anos (média: 54,75 anos), sendo todos os casos localizados em lábio inferior.

De todos os casos de QA, 75% (n=3) das amostras foram consideradas com atipia discreta segundo a Organização Mundial de saúde (OMS) e 100% foram consideradas como de “baixo risco” de acordo com a graduação de Kujan (2006). As informações detalhadas em relação às amostras de QA estão contidas no apêndice 5.

Foram ainda utilizadas cinco lesões reativas (LR) do lábio inferior, representadas por mucocele, fibroma e fibrolipoma.

5.2 Expressão das proteínas Bcl-2, p16^{INK4a} e Ciclina D1

A expressão das proteínas Bcl-2, p16^{INK4a} e ciclina D1 (neste trabalho chamada de status de marcação - positivo ou negativo), foi verificada por meio de reações imunohistoquímicas. Observou-se, em grande parte das vezes, variação na intensidade de marcação, o que não foi levado em consideração neste trabalho, pois a presente análise foi qualitativa, ou seja, relacionada à expressão da proteína e também de maneira semi-quantitativa, voltada para o percentual de células marcadas considerando-se a extensão da área histológica de cada caso de CEL analisado.

5.2.1 Proteína Bcl-2

Carcinoma epidermóide de lábio

Das 17 amostras selecionadas para este estudo, três foram excluídas devido a ausência de material suficiente para análise. Das 14 amostras selecionadas para esta proteína, 57,1% (n=8) eram BD, 35,7% (n=5) MD e 7,2% (n=1) PD. Do total de casos, 42,8% (n=6) obtiveram positividade para este marcador, sendo todas de localização citoplasmática e metade delas com marcação adicional na membrana plasmática (n=3). Não houve relação estatística entre a expressão do Bcl-2 e a graduação histológica ($p=0,277$), apesar de metade dos casos positivos para esse anticorpo (n=3) pertencerem ao grupo das amostras MD. Além disso, dos 06 casos positivos, a maioria deles (83,3%; n=5) apresentou marcação em até no máximo 25% das células neoplásicas (uma cruz: +), sendo os outros 16,7% (n=1) entre 26-50% das células neoplásicas (duas cruces: ++).

Não houve relação estatística entre a expressão do Bcl-2 e a graduação histológica das lesões ($p>0,99$) de maneira que os cinco casos marcados com uma cruz (em até 25% das células) estavam dispostos de maneira homogênea nas diferentes graduações (2 BD, 2 MD e 1 PD), sendo o único caso com duas cruces (em até 50% das células) pertencente a graduação PD.

Não houve relação estatística entre o status de marcação do Bcl-2 (positivo ou negativo) em relação às diferentes áreas histológicas. Também não houve significância em relação ao percentual de marcação e as diferentes áreas histológicas (apêndice 7). No entanto, dos seis casos positivos para o Bcl-2, houve expressão da proteína predominantemente em cordões de células neoplásicas e nenhum caso foi positivo nas pérolas de queratina. Os casos positivos em relação às áreas foram dispostos da seguinte maneira: 4/6 para cordões (C), 2/6 para lençóis/massas e ilhas (LMI), 0/4 para pérolas de queratina (PQ), 2/6 para ilhotas (I) e

2/5 para células isoladas (CI), considerando-se que nem todos os seis casos positivos para o Bcl-2 possuíam todas as áreas histológicas avaliadas. A figura 6 ilustra alguns resultados das reações imunohistoquímicas para Bcl-2 e suas respectivas lâminas coradas em HE.

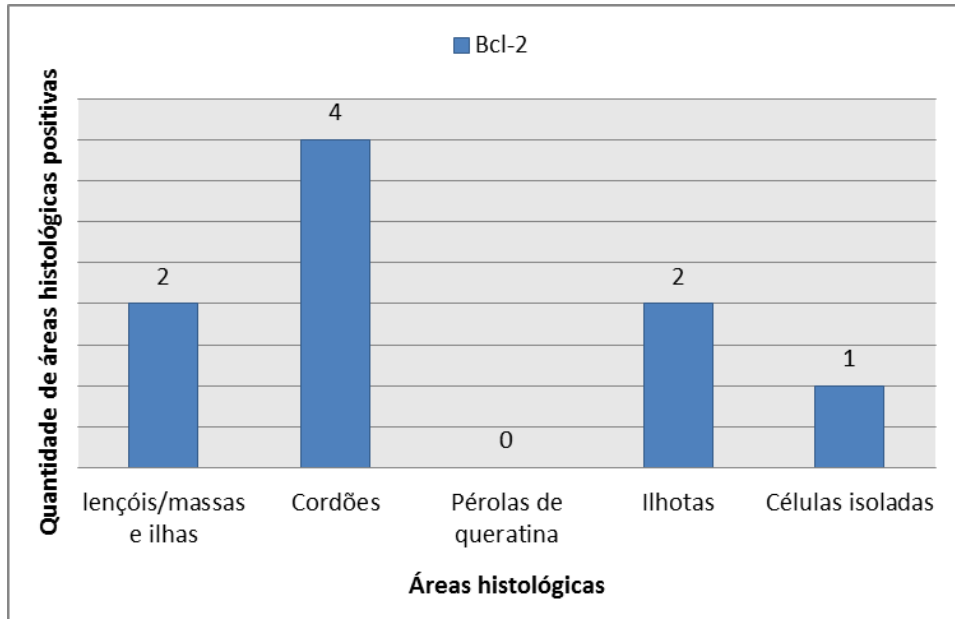


Gráfico 5: Distribuição da proteína Bcl-2 de acordo com as áreas histológicas presentes somente nos casos positivos para essa proteína.

Em alguns casos de CEL positivos para Bcl-2 foi observada marcação adicional no epitélio adjacente à lesão (n=3), sendo que alguns casos negativos para esta proteína também apresentaram marcação no epitélio adjacente (n=4). Todos esses casos foram restritos a camada basal do epitélio de superfície (Figura 7).

Queilite Actínica

Das quatro amostras selecionadas para este estudo, 75% (n=3) obtiveram marcação positiva para Bcl-2, todas com localização citoplasmática. Em relação ao percentual de marcação, houve distribuição homogênea entre os casos, sendo 1/3 +, 1/3+++ e 1/3 +++++, todos com 33,3%, não sendo observada nenhuma amostra com duas cruzes. Em relação à localização, todos os três casos ocorreram na camada basal do epitélio (Figura 8).

Lesões reativas da mucosa labial

Das cinco amostras selecionadas de lesões reativas da mucosa labial inferior, todas obtiveram marcação positiva (100%, n=5), sendo 40% (n=2) das amostras positivas entre 26-50% das células (duas cruces: ++) e 60% (n=3) das amostras positivas entre 51-75% das células epiteliais (três cruces: +++). Todas as amostras obtiveram localização restrita a camada basal do epitélio normal (Figura 9).

5.2.2 Proteína p16^{INK4a}

Carcinoma epidermóide de lábio

Das 17 amostras selecionadas para este estudo, uma foi excluída devido a ausência de material suficiente para análise. Do total de 16 amostras selecionadas para esta proteína, 68,7% (n=11) eram BD, 25% (n=4) MD e 6,3% (n=1) PD. Do total de casos, 68,7% (n=11) obtiveram marcação positiva da proteína p16^{INK4a}, todas com localização citoplasmática. Não houve relação estatística entre a expressão de p16^{INK4a} e graduação histológica (p>0,99), apesar de a maioria casos positivos para esse anticorpo (n=7) pertencerem ao grupo das amostras BD.

Além disso, dos 11 casos positivos, a maioria deles (72,7%; n=8) apresentou marcação em até no máximo 25% das células neoplásicas (uma cruz: +), sendo os outros três casos, cada um com 9,1% (n=1), sendo eles, respectivamente entre 26-50% das células neoplásicas (duas cruces: ++), 51-75% das células neoplásicas (três cruces: +++), e acima de 75% das células neoplásicas (quatro cruces: ++++).

Não houve relação estatística entre o percentual de células marcadas e a graduação histológica das lesões (p=0,364), porém dos oito marcados em até 25% de células (uma cruz:+) seis são BD.

Considerando-se as áreas histológicas, houve significância estatística entre a expressão da proteína p16^{INK4a} em relação à sua expressão somente em pérolas de queratina (p=0,033). Houve ainda, significância estatística inversamente proporcional entre o percentual de marcação da proteína p16^{INK4a} em células isodadas (p=0,036), sendo, portanto, de baixo percentual (até 25%) quando encontradas nessas células. Os casos positivos em relação às áreas histológicas foram dispostos da seguinte maneira: 4/10 para cordões, 6/11 para lençóis/massas e ilhas (LMI), 7/10 para pérolas de queratina (PQ), 2/10 para ilhotas (I) e 2/8 para células isoladas (CI), considerando-se que nem todos os 11 casos positivos para o p16^{INK4a} possuíam todas as áreas histológicas avaliadas (Figura 10). Houve marcação do epitélio adjacente ao tumor na camada basal em 28,57% (n=4) casos do total do número da amostra (Figura 11).

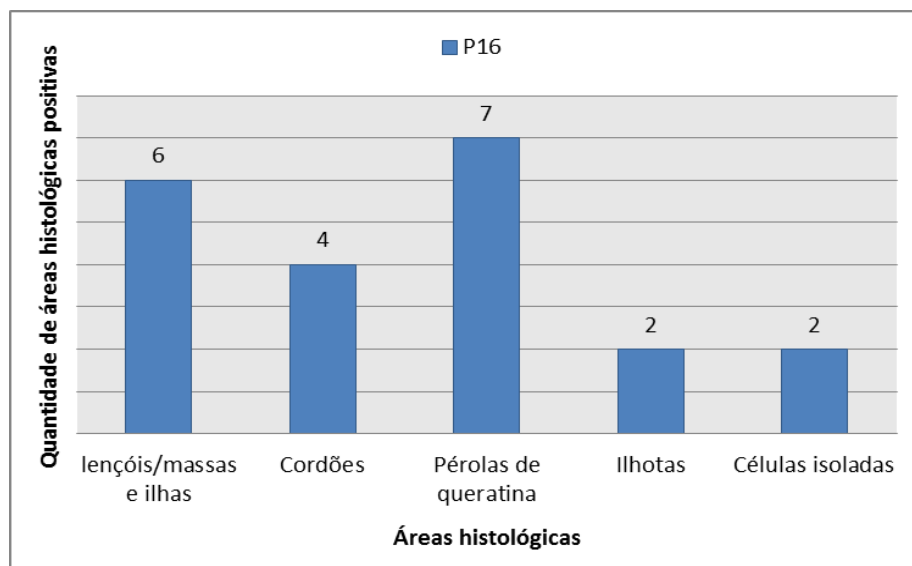


Gráfico 6: Distribuição da marcação positividade da proteína p16 em áreas histológicas.

Queilite Actínica

Das quatro amostras selecionadas para este estudo, 75% (n=3) obtiveram marcação positiva para p16^{INK4A}, todas com localização citoplasmática. Em relação ao percentual de marcação, sendo 66,6% (n=2) com marcação entre 26 a 50% de células neoplásicas e 33,3%

(n=1) entre 51% a 75% de células neoplásicas. Em relação à localização, três casos ocorreram na camada basal do epitélio e dois deles conjuntamente com a camada suprabasal do epitélio (Figura 12).

Lesões reativas do lábio

Dos quatro amostras selecionadas para este estudo, 75% (n=3) obtiveram marcação positiva para p16^{INK4a}, todas com localização citoplasmática. Em relação ao percentual de marcação, houve distribuição homogênea entre os casos, sendo 1/1+, 1/3+++ e 1/4++++, todos com 33,3% em relação à localização, dois estavam localizados em todas as camadas do epitélio e uma na camada basal do epitélio (Figura 13).

5.2.2 Proteína Ciclina D1

Carcinoma epidermóide de lábio

Das 17 amostras selecionadas para este estudo, uma foi excluída devido a ausência de material suficiente para análise. Do total de 16 amostras selecionadas para esta proteína, onze (68,7%) foram graduadas como BD, quatro (25%) MD e uma (6,25%) PD. Do total de 16 casos, 37,5% (n=6) obtiveram marcação positiva, todas localizadas no núcleo da célula. Não houve relação estatística entre a expressão do Bcl-2 e a graduação histológica (p= 0,753), apesar da maioria dos casos positivos para esse anticorpo (83,3%, n=5) pertencerem ao grupo das amostras BD. Além disso, dos 06 casos positivos, a maioria deles (66,7%; n=4) apresentou marcação em até no máximo 25% das células neoplásicas (uma cruz: +), sendo 16,7% (n=1) entre 26-50% das células neoplásicas (duas cruces: ++) e os outros 16,7% (n=1) marcação entre até 51-75% das células neoplásicas (três cruces: +++).

Não houve relação estatística entre o percentual de células marcadas para CD1 e a graduação histológica das lesões ($p>0,99$), apesar de 75% (3/4) dos casos marcados com uma cruz (em até 25% das células) estarem no grupo BD.

Não houve relação estatística entre a expressão da CD1 em relação às diferentes áreas histológicas. Também não houve significância em relação ao percentual de marcação da CD1 e as diferentes áreas histológicas (apêndice 7). No entanto, dos seis casos positivos para CD1, houve expressão da proteína predominantemente em cordões de células neoplásicas e nenhum caso foi positivo em células isoladas. Os casos positivos em relação às áreas foram dispostos da seguinte maneira: 5/5 para C, 3/6 LMI, 3/6 para PQ, 1/5 para I e 0/4 para CI, considerando-se que nem todos os seis casos positivos para o Bcl-2 possuíam todas as áreas histológicas avaliadas (Figura 14).

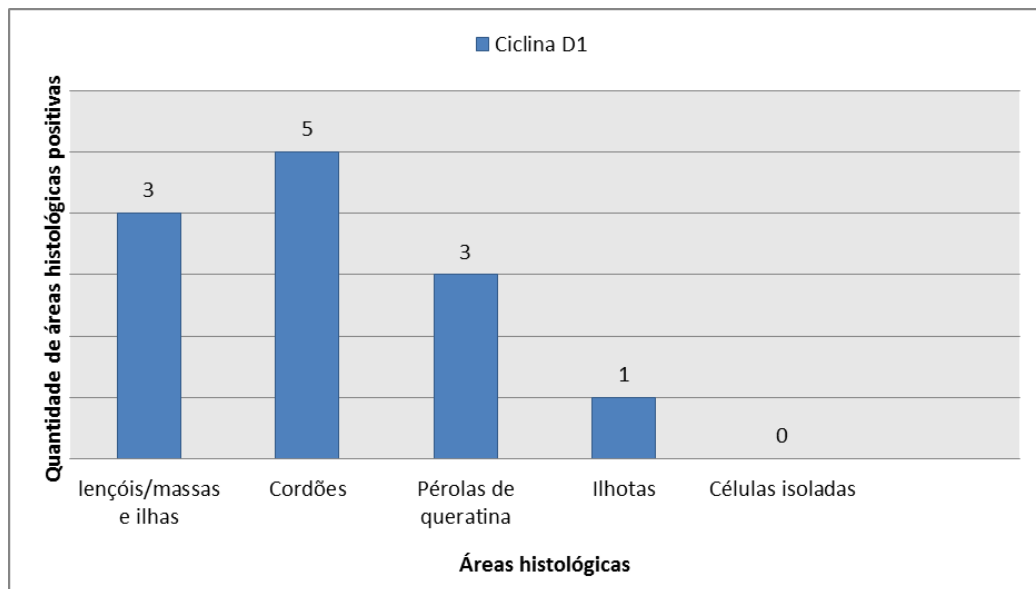


Gráfico 7: Distribuição da marcação positividade da proteína ciclina D1 em áreas histológicas.

Houve marcação citoplasmática do epitélio adjacente ao tumor na camada basal somente em um caso de carcinoma epidermóide de lábio.

Queilite Actínica

Dos quatro amostras selecionadas para este estudo 75% (n=3) obtiveram marcação positiva para ciclina D1, todas com localização nuclear. Em relação ao percentual de marcação, 66,6% (n=2) apresentaram marcação em até 25% das células neoplásicas e 33,3% (n=1) com marcação entre 51% a 75% das células neoplásicas (três cruzes:+++). Em relação à localização, três casos ocorreram na camada suprabasal, sendo que em um deles conjuntamente na camada basal do epitélio (Figura 15).

Lesões reativas do lábio

Das cinco amostras selecionadas para este estudo 60% (n=3) obtiveram marcação positiva para ciclina D1, todas com localização nuclear. Em relação ao percentual de marcação 100% (n=3) obtiveram marcação entre 51% a 75% de células neoplásicas (três cruzes: +++). Em relação à localização, dois casos ocorreram na camada suprabasal e um na camada basal do epitélio (Figura 16).

Consolidação dos dados da imunoistoquímica para as proteínas Bcl-2, p16^{INK4a} e Ciclina D1

D1.

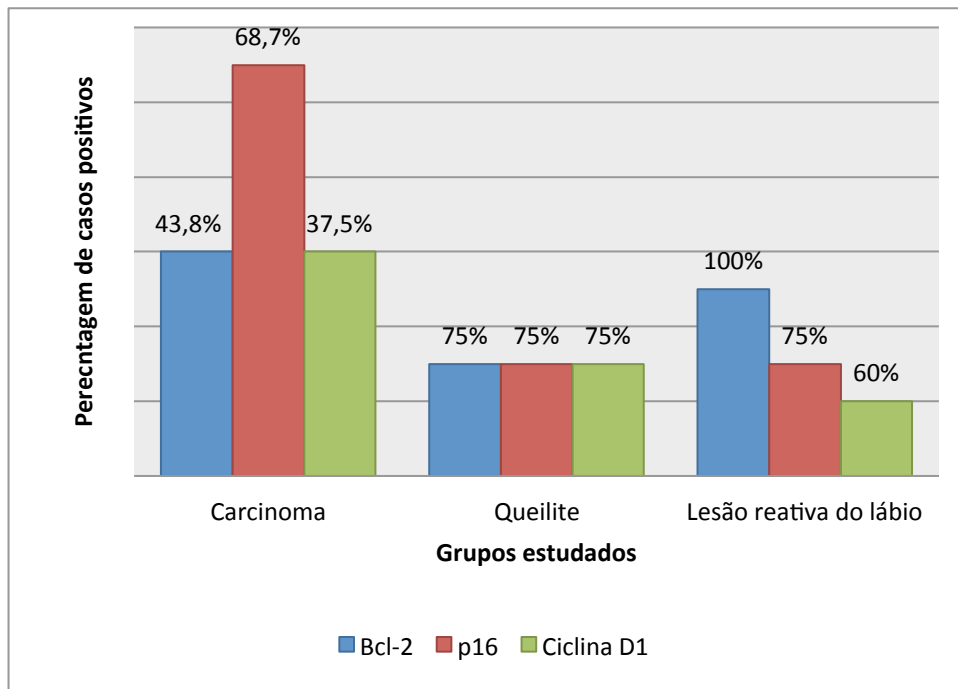


Gráfico 8: Distribuição da positividade nos grupos.

Tabela 3: Distribuição da positividade para o grupo dos carcinomas epidermóides labiais.

| <u>Proteína</u> | <u>Positivos/ número de casos</u> | <u>Percentual</u> |
|-----------------|---------------------------------------|-------------------|
| Bcl-2 | 6/14 | 42,8% |
| P16 | 11/16 | 68,7% |
| Ciclina D1 | 6/16 | 37,5% |

Tabela 4: Distribuição da positividade no grupo dos carcinomas epidermóides labiais, dentro da classificação histológica e do número de casos que os compõe.

| <u>Gradação Histológica</u> | <u>Bcl-2</u> | <u>p16^{INK4a}</u> | <u>Ciclina D1</u> |
|---------------------------------|--------------|----------------------------|-------------------|
| Bem diferenciado | 25% | 63,6% | 45,4% |
| Moderadamente diferenciado | 60% | 75% | 25% |
| Pouco diferenciado | 100% | 100% | - |

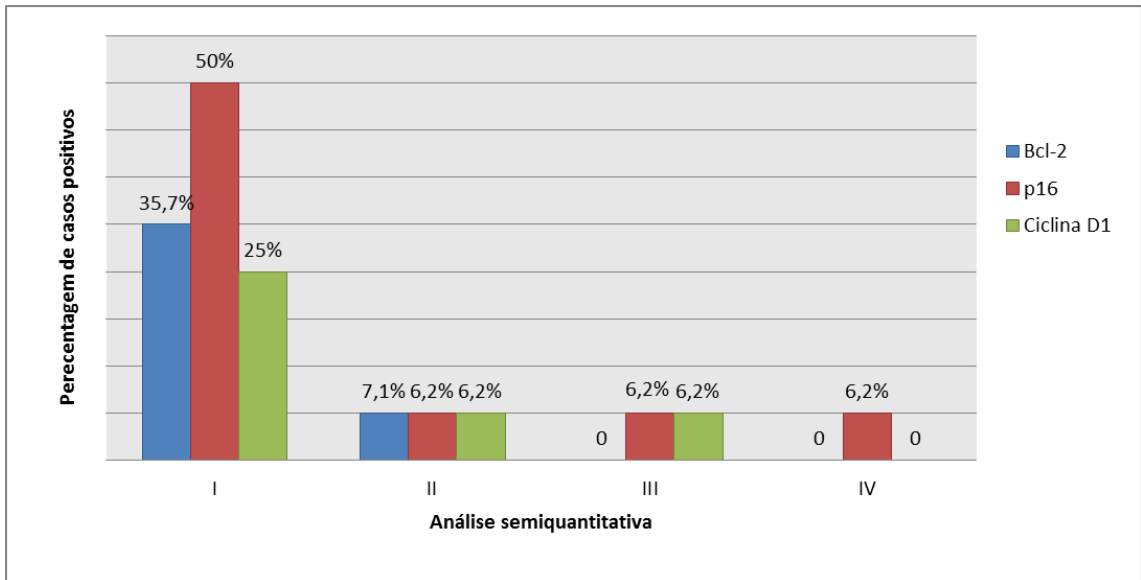


Gráfico 9: Distribuição do percentual de marcação no grupo dos carcinomas epidermóides labiais.

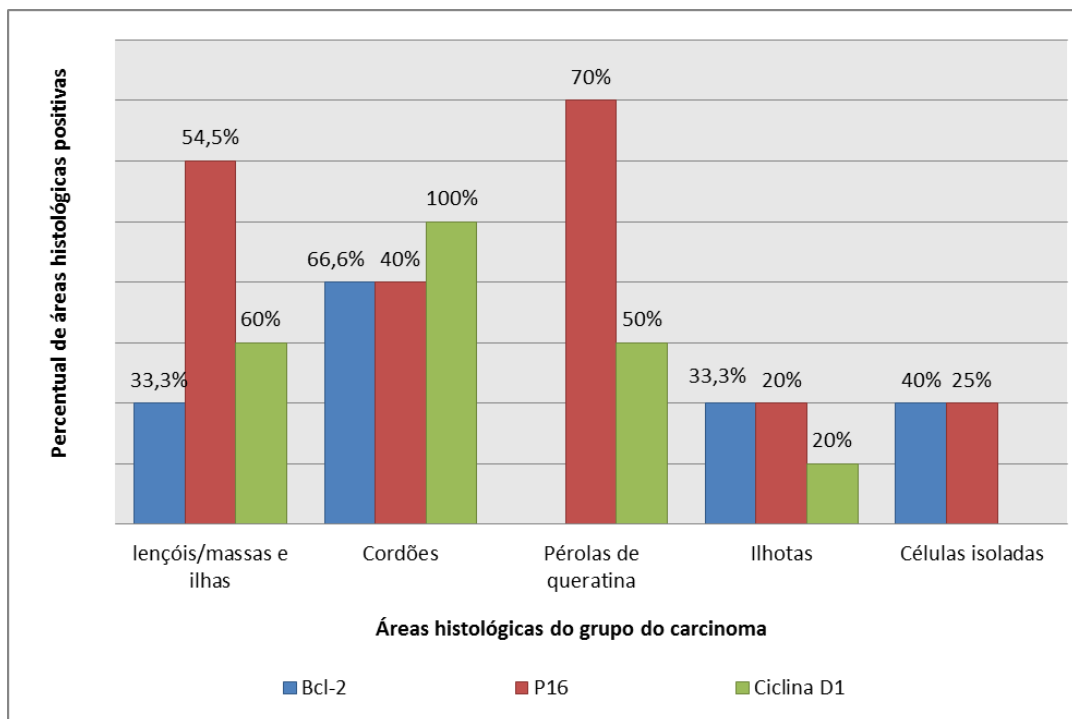


Gráfico 10: Distribuição da marcação positiva de áreas histológicas para as proteínas Bcl-2, p16 e Ciclina D1 em carcinoma epidermóide de lábio.

Tabela 5: Distribuição da positividade para o grupo de queilites actínicas.

| <u>Proteína</u> | <u>Positivos/ número de casos</u> | <u>Percentual</u> |
|-----------------|---------------------------------------|-------------------|
| Bcl-2 | $\frac{3}{4}$ | 75% |
| P16 | $\frac{3}{4}$ | 75% |
| Ciclina D1 | $\frac{3}{4}$ | 75% |

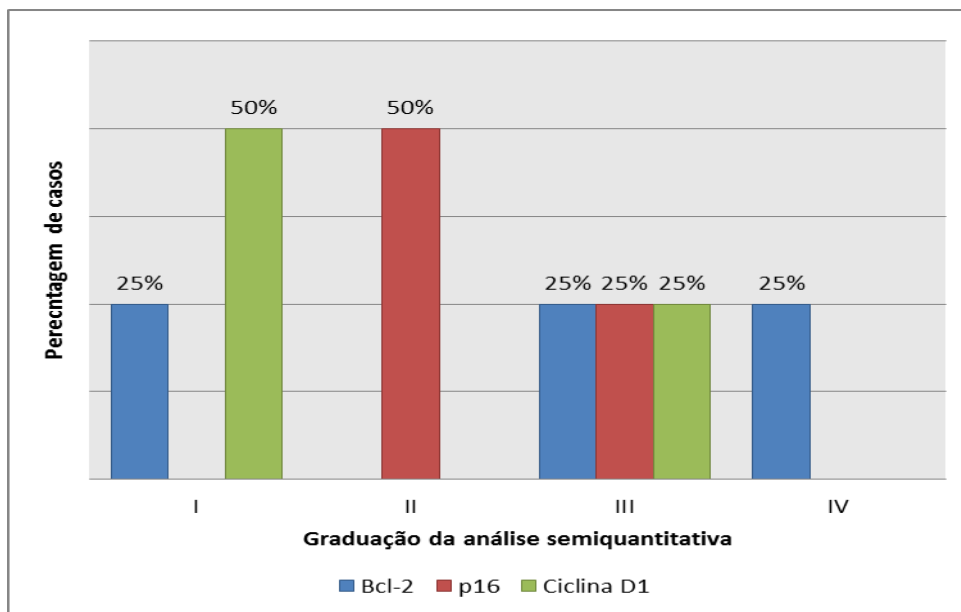


Gráfico 11: Distribuição da graduação da análise semiquantitativa dentro do grupo da queilite actínica.

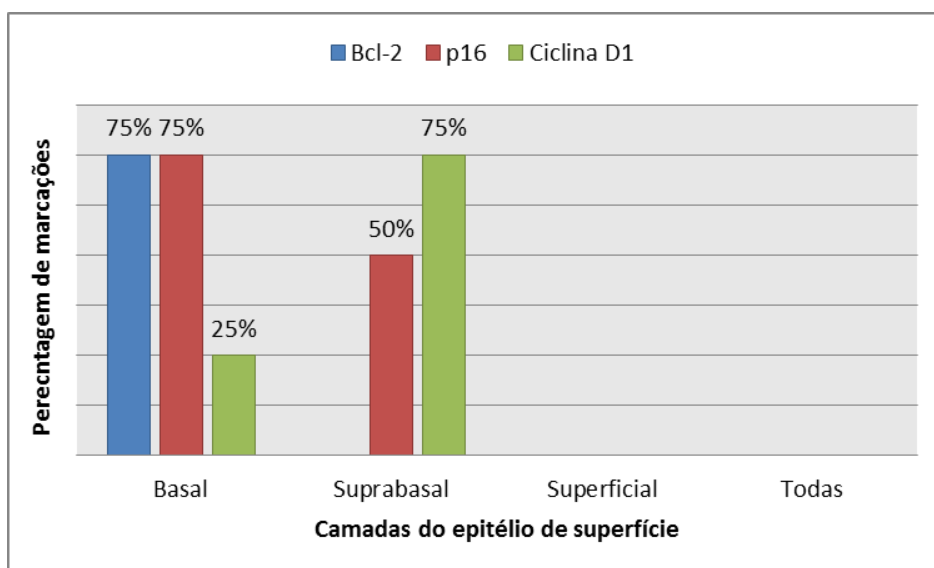


Gráfico 12: Distribuição da marcação positiva de áreas morfológicas para as proteínas Bcl-2, p16 e Ciclina D1 em queilite actínica.

Tabela 6: Distribuição da positividade para o grupo das lesões reativas.

| <u>Anticorpo</u> | <u>Positivos/ número de casos</u> | <u>Percentual</u> |
|------------------|---------------------------------------|-------------------|
| Bcl-2 | 5/5 | 100% |
| P16 | 3/4 | 75% |
| Ciclina D1 | 3/5 | 60% |

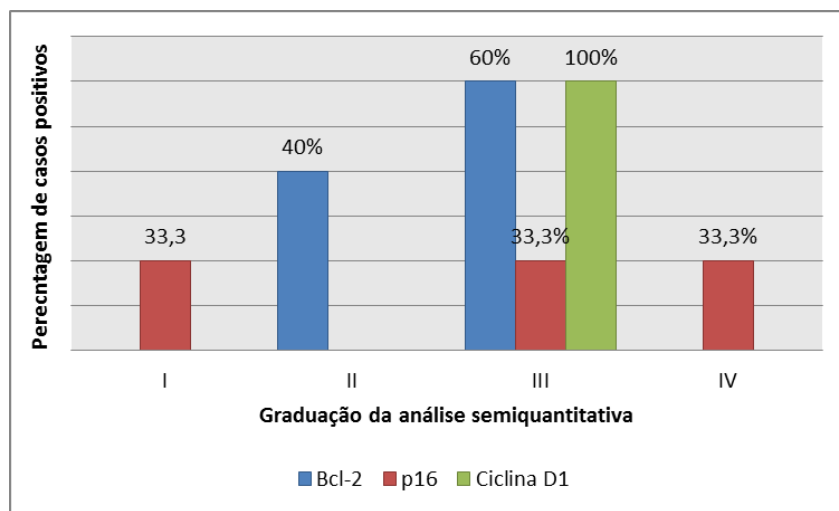


Gráfico 13: Distribuição da graduação da análise semiquantitativa dentro do grupo da lesão reativa de lábio.

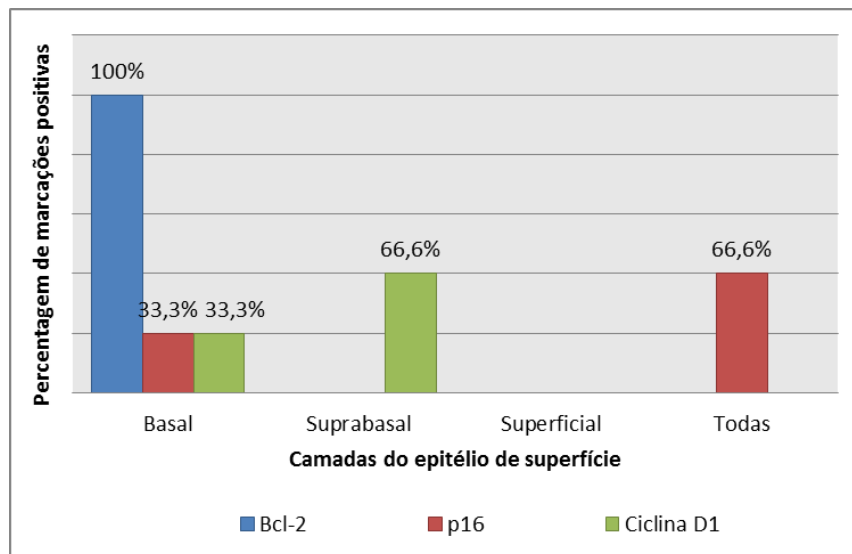


Gráfico 14: Distribuição da marcação positiva de camadas do epitélio para as proteínas Bcl-2, p16 e Ciclina D1 em lesão reativa.

Análise Estatística das proteínas Bcl-2, p16^{INK4a} e Ciclina D1 entre si

Em relação às correlações consideradas estatisticamente relevantes neste trabalho, houve significância estatística entre:

- A expressão da proteína Bcl-2 em CEL em relação à LR do lábio inferior (p=0,046)
- O percentual de marcação da proteína Bcl-2 em CEL em relação à LR do lábio inferior (p=0,015).
- O percentual de marcação da proteína p16^{INK4a} em CEL em relação à QA (p=0,055).

Todas as análises estatísticas estão especificadas no apêndice 7.

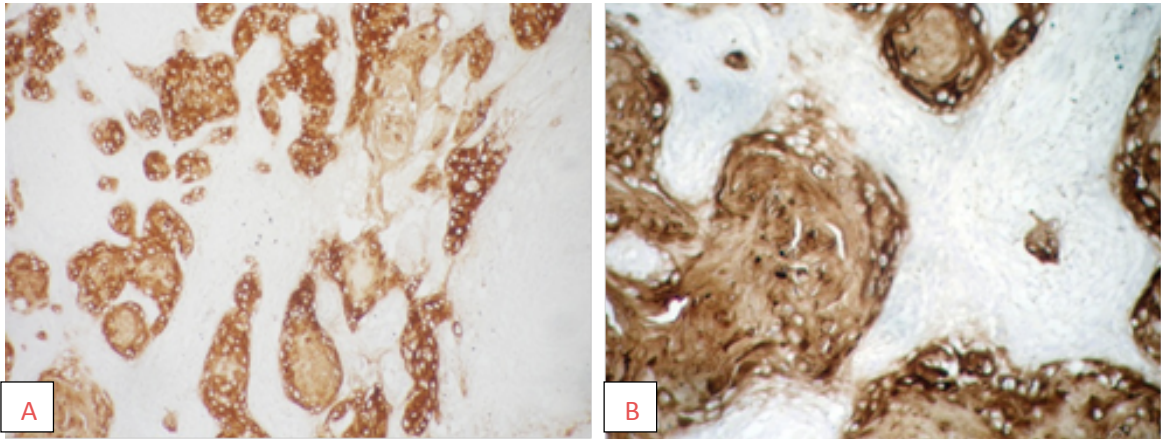


Figura 3: Carcinoma epidermóides labial bem diferenciado – Marcação de AE1 e AE3 - Aumento de 100x (A) e 400x (B).

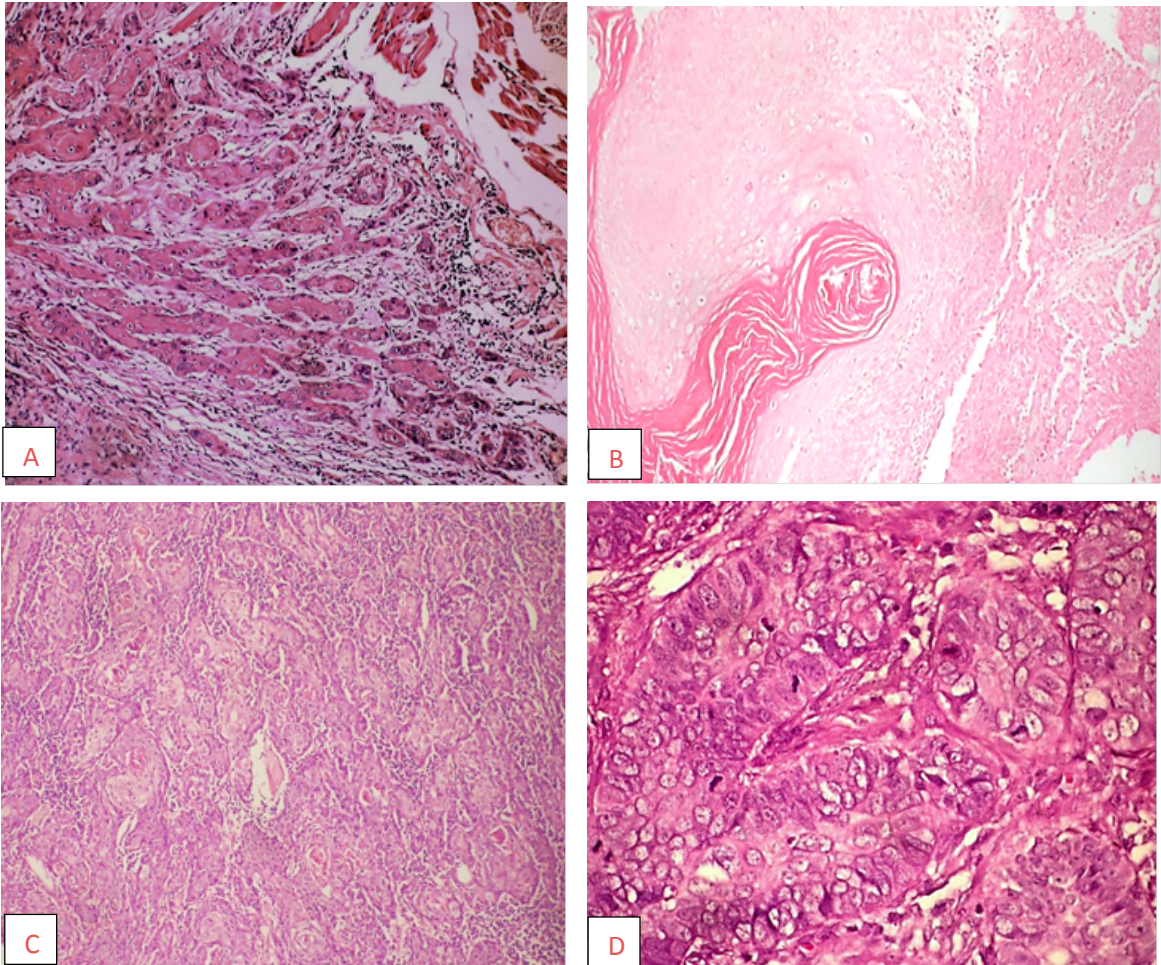


Figura 4: A: Carcinoma de células escamosas bem diferenciado (BD) evidenciando cordões de células neoplásicas-HE-Aumento de 100x; B: Carcinoma epidermóide de lábio bem diferenciado (BD) – pérola de queratina –HE- Aumento de 100x; C: Carcinoma epidermóide labial moderadamente diferenciado (MD) evidenciando cordões de células neoplásicas- HE- Aumento de 100x; D: Carcinoma epidermóide labial pouco diferenciado (PD) evidenciando numerosas mitoses atípicas- HE- Aumento de 100x.

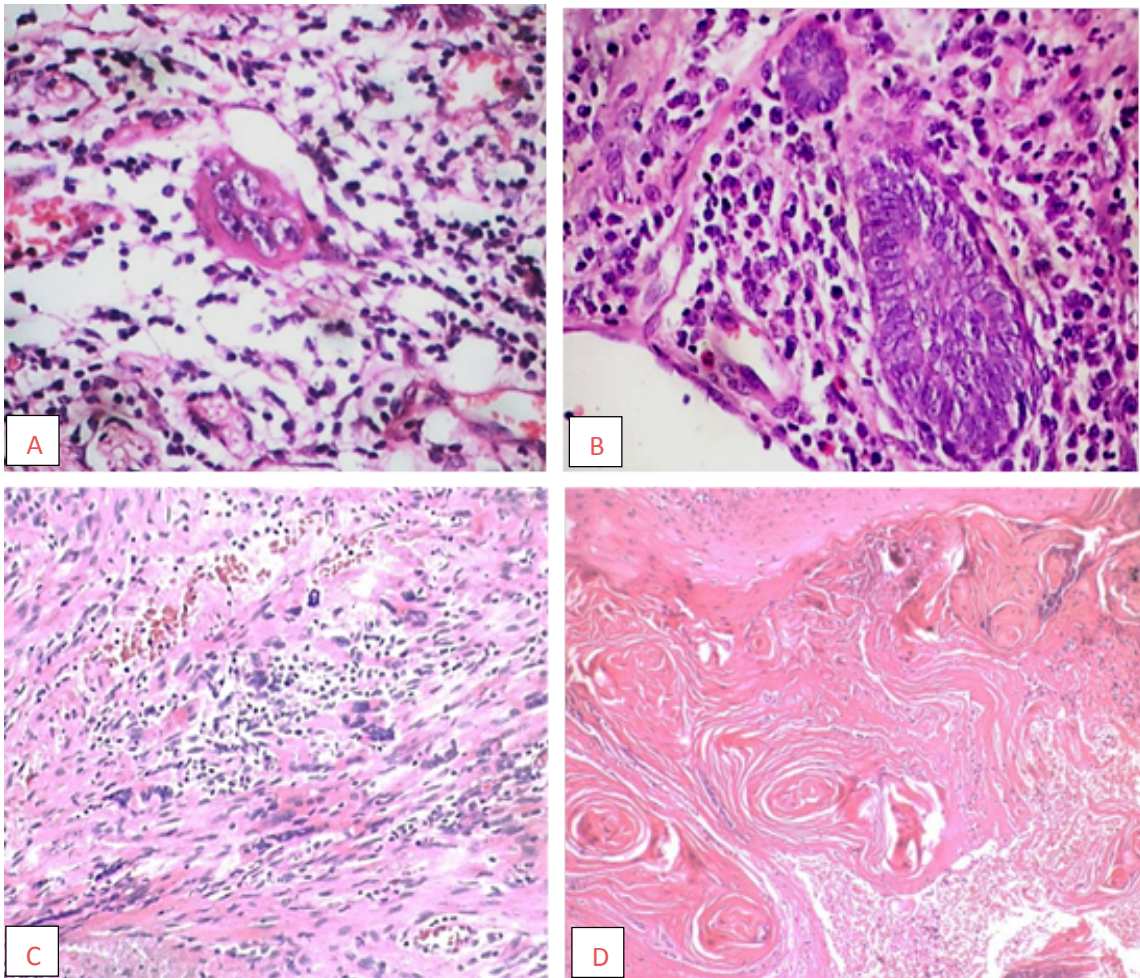


Figura 5: Carcinoma epidermóide de lábio: (A) visualização de uma ilhota – Aumento de 400x; (B) cordão de ilhota de células neoplásicas – Aumento de 400x; (C) lençóis/massas e ilhas com células isoladas alongadas – Aumento de 200x; (D) Pérolas de queratina – Aumento de 100x;

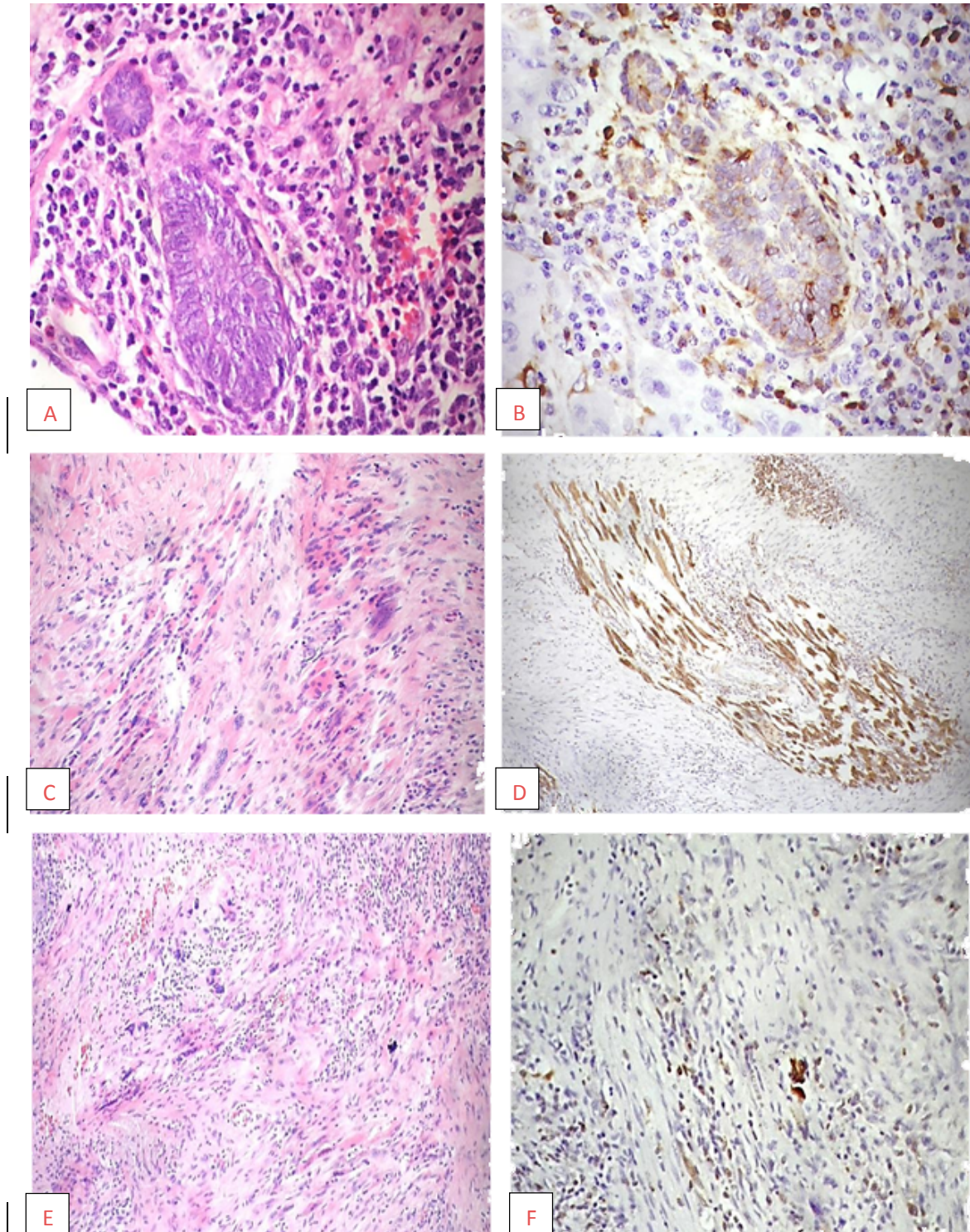


Figura 6: Expressão da proteína Bcl-2 em carcinoma epidermóides de lábio. (A) HE de câncer de lábio exibindo cordão e ilha com infiltrado inflamatório; (B) IHQ de corte pareado de (A) exibindo positividade do cordão e ilha e marcação do controle endógeno (infiltrado); (C) HE de Massa de células neoplásicas; (D) IHQ pareando de massa de células neoplásicas exibindo um infiltrado logo acima marcado; (E) HE exibindo células isoladas; (F) IHQ pareando com HE mostrando marcação de células neoplásicas- (A) e (B)- aumento de 400x; (C) e (D)- Aumento de 200x e (E) e (F)-Aumento de 100x.

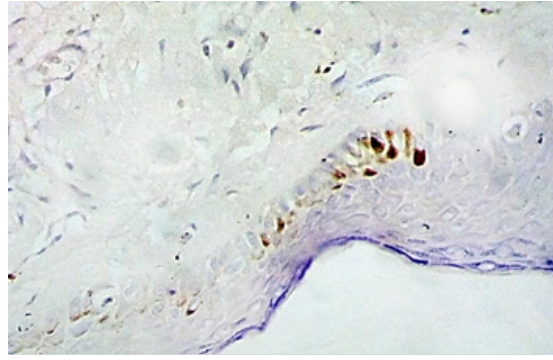


Figura 7: Carcinoma epidermóide de lábio com expressão citoplasmática da proteína Bcl-2 no epitélio – Aumento 400x.

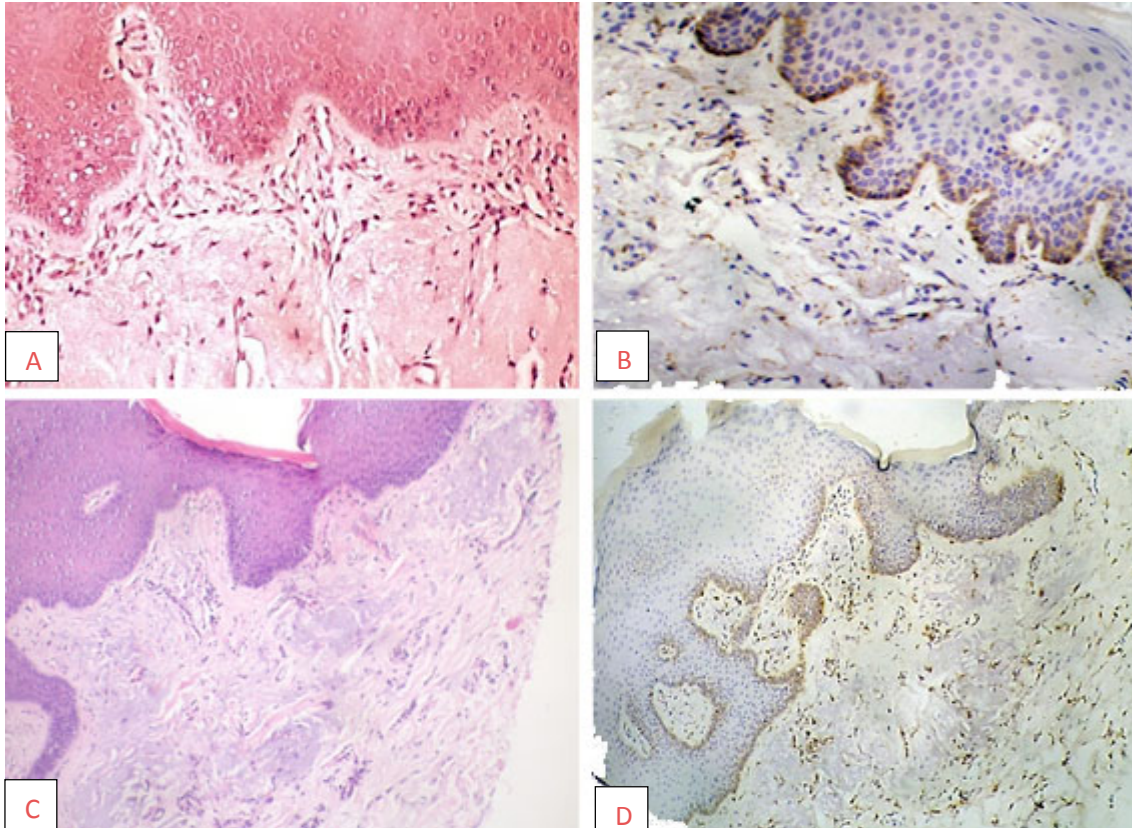


Figura 8: Queilite actínica: (A) HE mostrando epitélio com elastose no tecido conjuntivo; (B) IHQ de Bcl-2 mostrando marcação citoplasmática; (C) HE exibindo área de queratinização logo acima do epitélio com elastose no tecido conjuntivo; (D) IHQ de Bcl-2 pareando com HE do (C) e mostrando em um maior aumento área de marcação – Aumento (A) e (B) 200x e (C) e (D) aumento de 100x – Aumento de 400x.

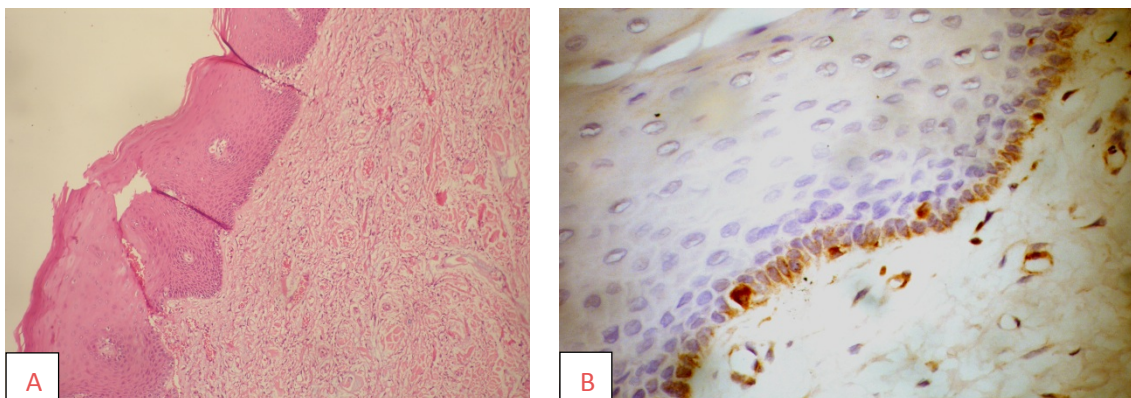


Figura 9: Lesões reativas: (A) HE de fibrolipoma-Aumento de 200x; (B) mesmo caso que de (A) marcação de Bcl-2- Aumento de 400x.

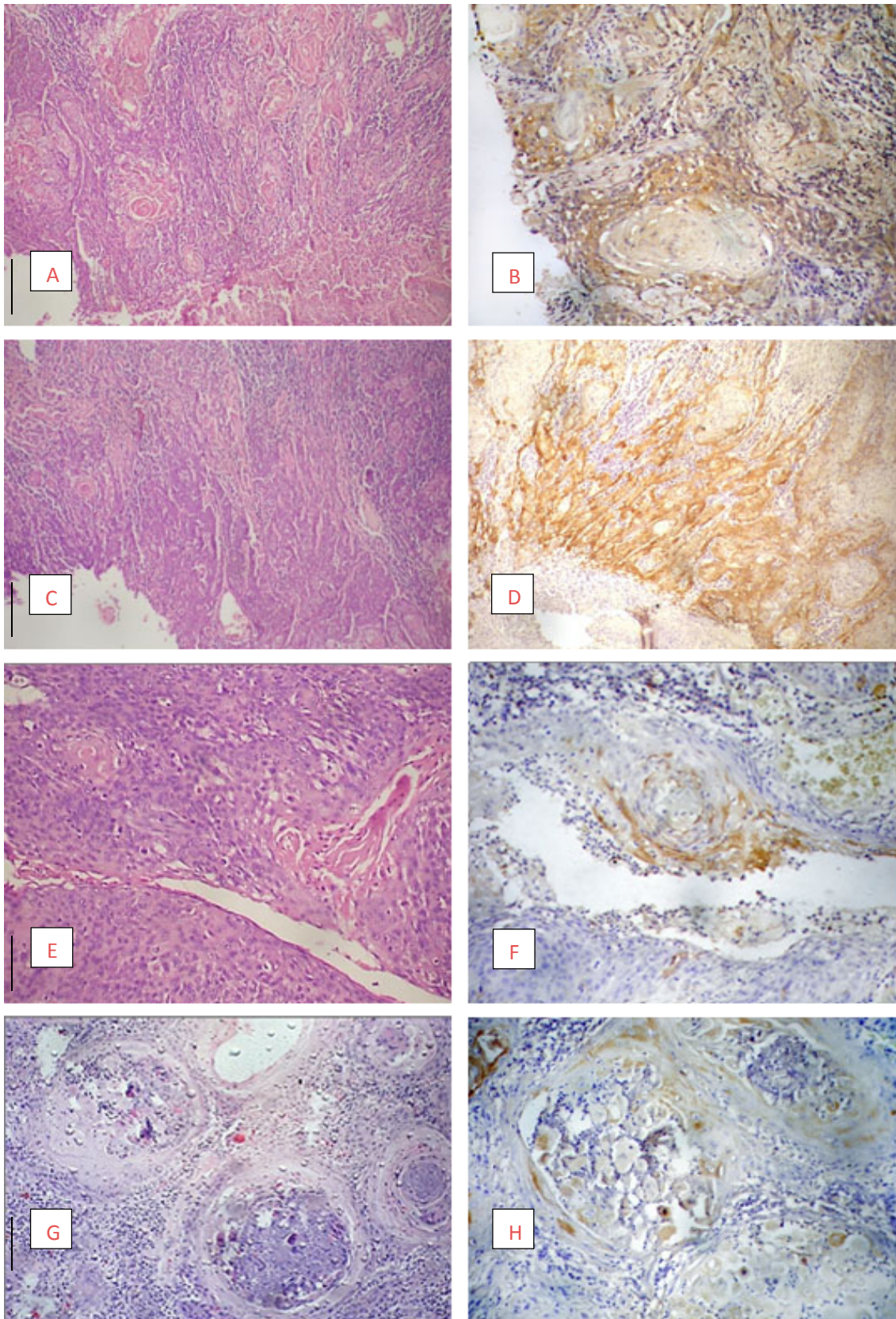


Figura 10: Carcinoma epidermóide de lábio; (A) HE de CEL moderadamente diferenciado exibindo pérolas e cordões; (B) IHQ de p16 do mesmo caso de (A) exibindo positividade de pérolas, lençóis, massas/ ilhas e cordões; (C) HE de CEL moderadamente diferenciado mostrando cordões de células neoplásicas; (D) IHQ de p16 pareando com o (C) mostrando positividade dos cordões; (E) HE de CEL bem diferenciado exibindo massas/lençóis/ilhas e pérola (F) IHQ exibindo positividade de pérola marcada; (G) HE de CEL bem diferenciado mostrando pérola em formação; (H) IHQ de p16 pareando com (F) mostrando pérola marcada – Aumento de 200x (A), (B), (C) e (D); (E) e (G) de 200x; (F) e (H) de 400x.

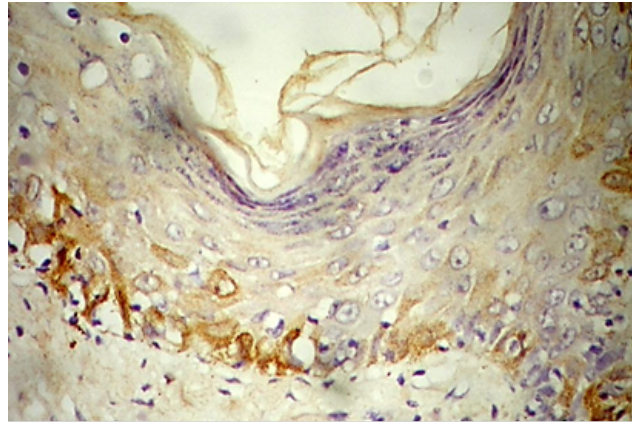


Figura 11: CEL de lábio bem diferenciado exibindo marcação citoplasmática em epitélio adjacente a lesão- Aumento de 200x.

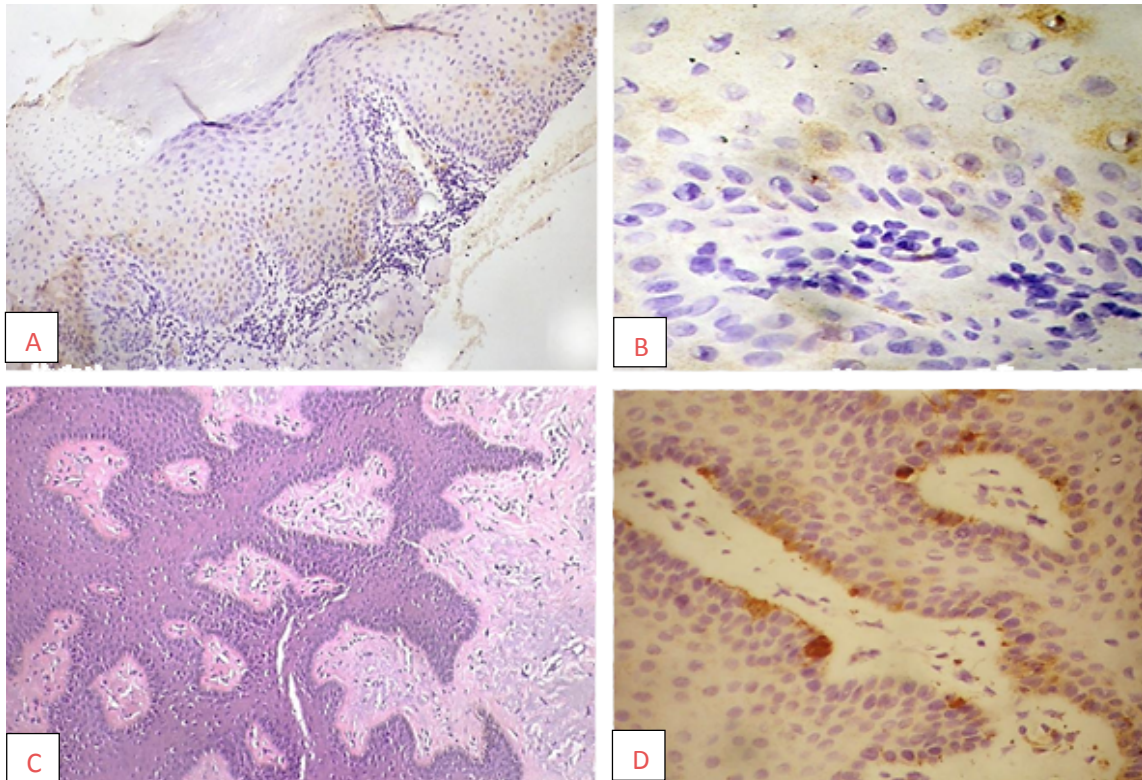


Figura 12: Queilite actínica; (A) IHQ de p16 de QA moderada e baixo risco mostrando marcação da camada basal e suprabasal; (B) IHQ de ciclina p16 do mesmo caso de (A) porém em maior aumento mostrando citoplasma de células do epitélio com marcação positiva; (C) IHQ de QA Discreto e baixo risco mostrando epitélio e elastose solar; (D) IHQ de p16 do mesmo caso exibindo marcação basal. – Aumento de 100x (A); (B) 200x; (C) e (D) e 400x.

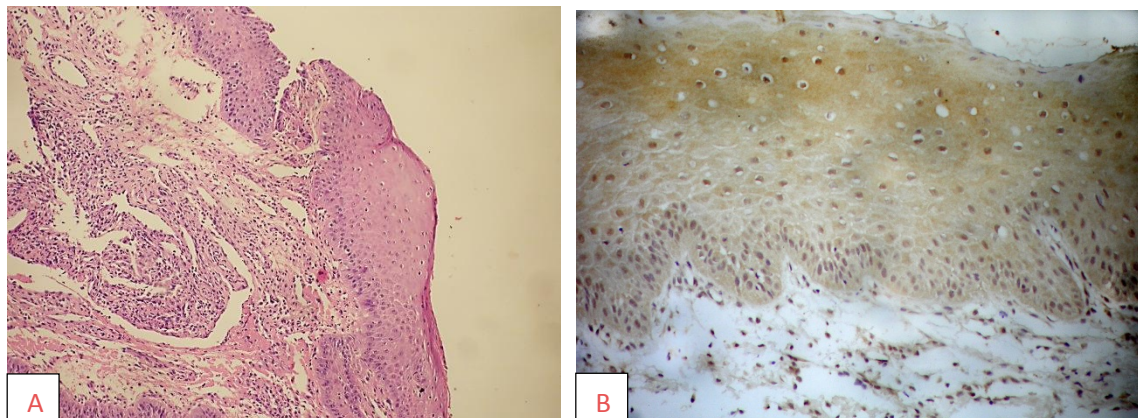


Figura 13: (A) Fibroma-Aumento de 100x; (B) p16 citoplasma marcado, porém pode-se visualizar marcação nuclear por Ki67- Aumento de 200x.

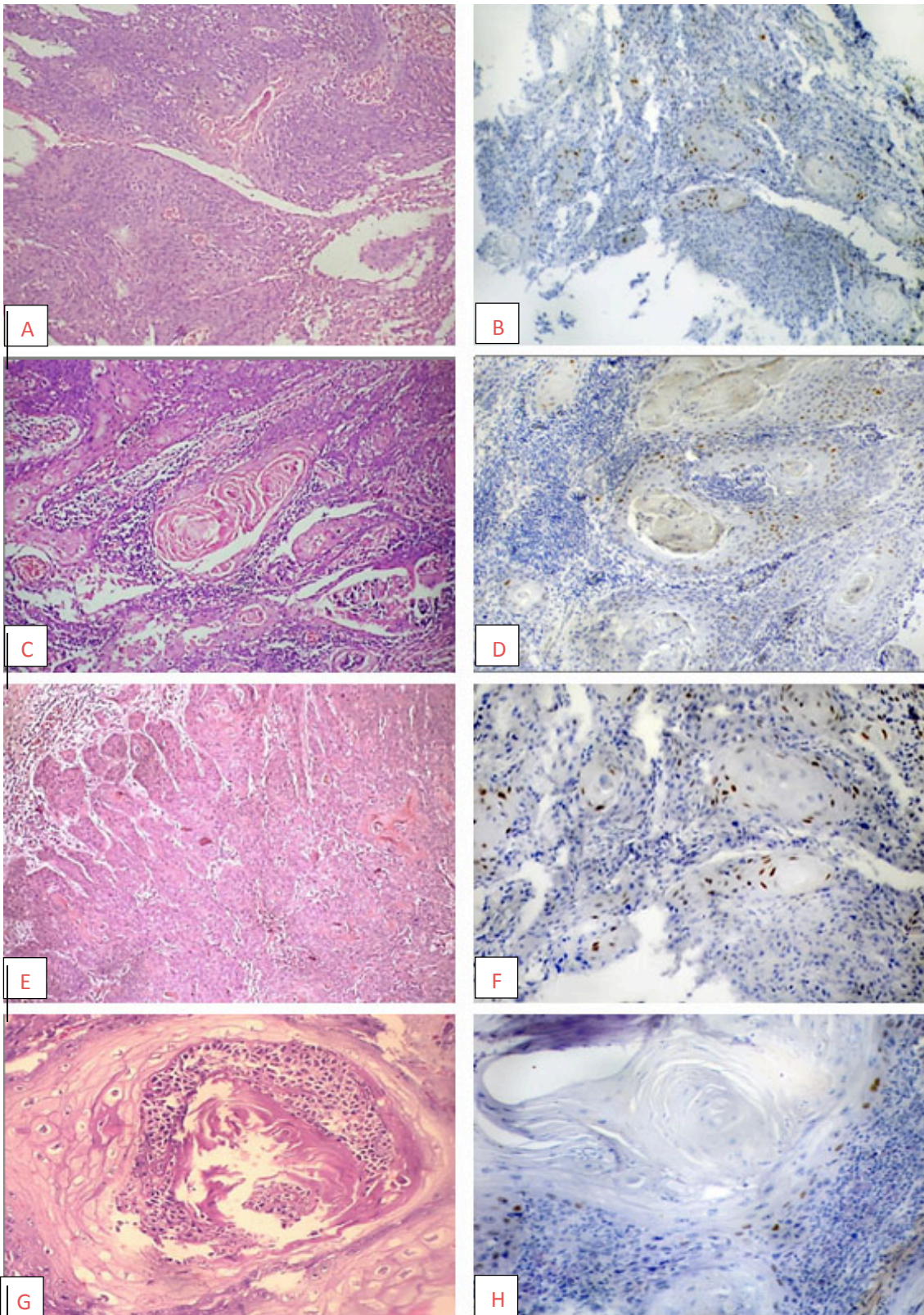


Figura 14: Carcinoma epidermóide de lábio; (A) HE de CEL bem diferenciado exibindo marcação de pérolas e cordões de células neoplásicas; (B) IHQ de ciclina D1 do mesmo caso de (A) exibindo positividade dos cordões e pérolas; (C) HE de CEL bem diferenciado mostrando pérolas de queratina e massas/lençóis e ilhas; (D) IHQ de ciclina D1 pareando com o (C) mostrando positividade das pérolas de queratina e massas/lençóis e ilhas; (E) HE de CEL moderadamente diferenciado exibindo cordões de células neoplásicas (F) IHQ do mesmo caso de (E) mostrando positividade dos cordões marcados; (G) HE de CEL moderadamente diferenciado mostrando pérola em formação; (H) IHQ de ciclina D1 pareando com (F) mostrando pérola marcada – Aumento de 200x (A), (C); (D) e (E); (B) de 100x; (G) (F) e (H) de 400x.

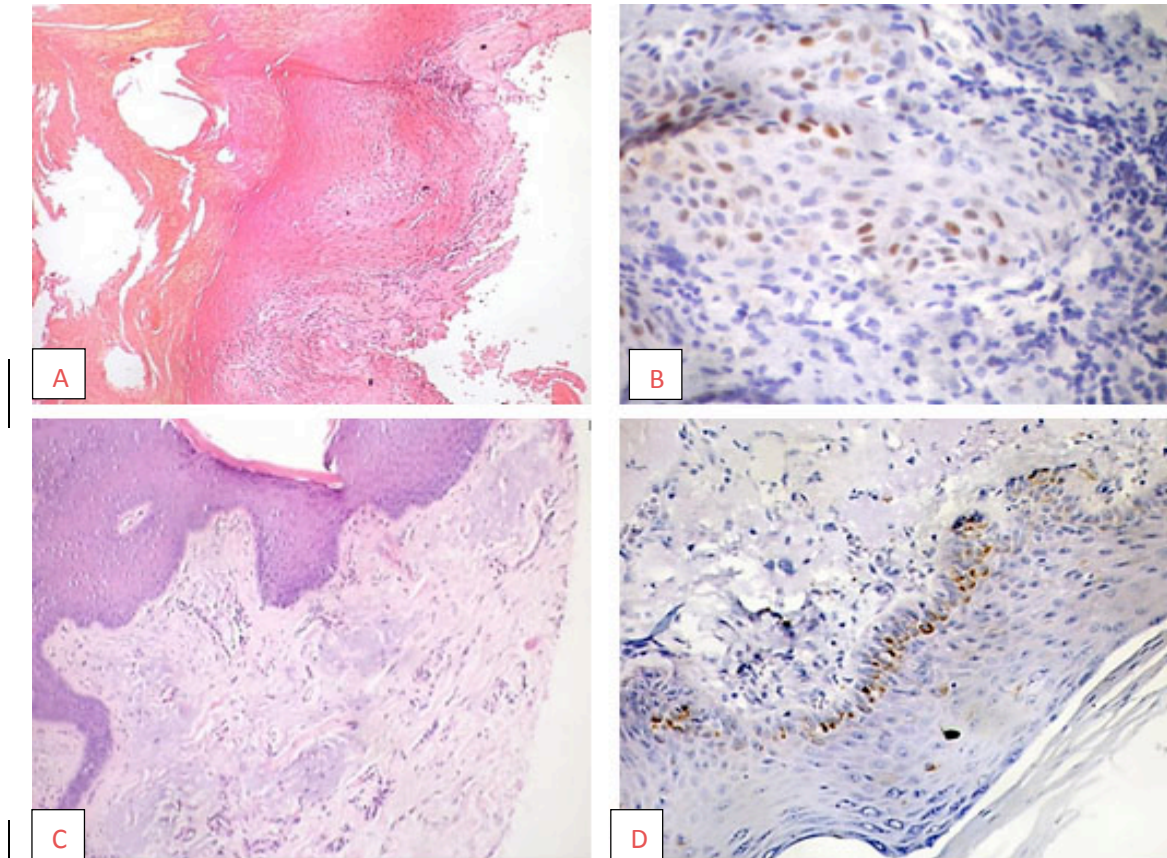


Figura 15: Queilite actínica; (A) HE de QA moderada e baixo risco mostrando bastante queratinização e epitélio; (B) IHQ de ciclina D1 do mesmo caso de (A) em um maior aumento exibindo positividade de células na camada suprabasal; (C) HE de QA Discreto e baixo risco mostrando epitélio com uma camada de queratina e elastose solar; (D) IHQ de ciclina D1 do mesmo caso de (C) mostrando positividade de marcação no epitélio na camada suprabasal e basal – Aumento de 200x (A), (C); (D) e 400x (B);

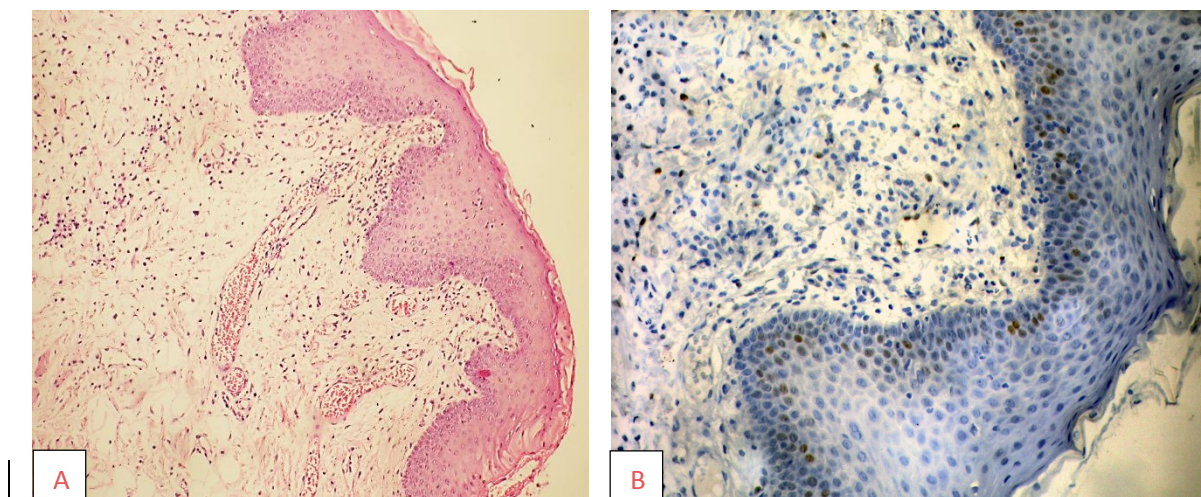


Figura 16: (A) Mucocele – Aumento de 100x; (B) Expressão de ciclina D1 do mesmo caso-Aumento de 200x.

6. DISCUSSÃO

Há muitos séculos, o câncer foi considerado uma doença dos países desenvolvidos e com grandes recursos financeiros. Esse panorama vem mudando há aproximadamente quatro décadas, passando a ser uma doença de países em desenvolvimento e com poucos recursos. Assim, o câncer ganhou uma grande dimensão tornando-se um evidente problema de saúde pública (INCA 2011).

Segundo o INCA (2008), o câncer de boca inclui os cânceres de lábio e de cavidade oral. Nesse contexto, o câncer de lábio é o tumor mais comum da boca e corresponde a 25% das neoplasias malignas dessa localização (VISSCHER et al., 1998, PEREIRA-FILHO et al., 2011). De acordo com Warnakulasuriya (2009) os maiores índices de acometimento de câncer labial encontram-se na Austrália e Canadá e mais de 50% dos cânceres orais da população australiana são no lábio. Já estatísticas brasileiras mostram que a incidência dessa neoplasia pode variar de 16,4% a 20,3% (DURAZZO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2009). O tipo histológico mais comum de câncer de boca é o carcinoma epidermóide ou espinocelular (cerca de 90 a 95% dos casos), respondendo em média por 40% dos casos dos cânceres de cabeça e pescoço (INCA 2011; VIEIRA et al., 2012).

O estudo do ciclo celular relacionado ao câncer tem despertado o interesse de numerosos pesquisadores em todo o mundo. As utilizações de técnicas de imunoistoquímica, usando marcadores biológicos de proliferação celular ajudam na melhor compreensão das alterações morfofuncionais que podem ocorrer no processo de transformação neoplásica (ARISAWA et al, 1999). O conhecimento desses marcadores que podem identificar a existência de tumores ou a predisposição a desenvolvê-los é de fundamental interesse no diagnóstico e prognóstico de vários tipos de câncer (FIGUEIREDO et al., 2003). A imuno-histoquímica representa uma ferramenta complementar importante na rotina diagnóstica do

câncer e para a identificação dos diferentes tipos histológicos e de fatores prognósticos (CAPELOZZI et al., 2009).

O presente estudo teve como objetivo principal verificar a expressão imunohistoquímica das proteínas Bcl-2, p16^{INK4A} e Ciclina D1 em amostras de pacientes portadores de carcinomas epidermóides de lábio (CEL). Adicionalmente nessas amostras, foi realizada uma comparação da expressão dessas proteínas com a expressão observada em amostras de pacientes portadores de queilites actínicas (QA), utilizadas por apresentarem comportamento “pré-maligno”, antecedendo geralmente, mas nem sempre os CELs. (VAN DER WAAL et al., 2009; CATALDO; DOKU, 1981; MARKOPOULOS et al., 2004) e lesões reativas (LR) do lábio inferior, utilizadas como controle de tecido “normal” pois consideramos que essas lesões apresentam padrão reativo similar ao padrão de comportamento reacional benigno, estando do ponto de vista neoplásico livres de possíveis alterações genéticas voltadas para o processo de carcinogênese. Um cuidado que tivemos com essas amostras é que as mesmas fossem oriundas da região labial interna pelo fato de estar no mesmo local de interesse do estudo e por não apresentar alterações compatíveis com as alterações desencadeadas pela radiação solar, possibilitando, portanto, seu estudo como controle.

A análise da expressão das proteínas Bcl-2, p16^{INK4A} e ciclina D1 nas amostras de pacientes portadores de CEL foi realizada de maneira semiquantitativa, por meio de um percentual de marcação para cada proteína. Além disso, a expressão das proteínas foi avaliada levando-se em consideração não somente a graduação histológica da amostra selecionada como também as suas diferentes áreas histológicas o que pode traduzir-se em diferentes graus de diferenciação celular, com base no fato de que o carcinoma epidermóide apresenta uma população de células mistas. O objetivo dessa abordagem foi verificar mais especificamente, se a expressão da proteína pode estar relacionada a características histopatológicas e, por

consequente ao grau de diferenciação celular. Foi realizada conjuntamente a correlação com alguns dados epidemiológicos tais como a raça, sexo e idade.

Um fator limitante deste estudo ocorreu, sobretudo, em função da casuística baixa tanto para os casos de CEL quanto para os de QA, o que pode ter dificultado as análises estatísticas. Alguns estudos apontam que não há um número ideal de amostras a serem estudadas e que um número passível de avaliação estatística significativa representa um parâmetro suficiente de análise (BALASSIANO, 2004).

No estudo retrospectivo de ONO (2011), durante o ano de 1998-2009, realizado na Fundação Centro de Controle de Oncologia (FCECON), mesmo local em que coletamos a maioria das nossas amostras, foram encontrados apenas 6% de casos de CEL. Neste estudo, totalizamos 17 casos passíveis de análise. Uma possível explicação para nossa baixa casuística, além dos casos excluídos devido a limitações técnicas, reside no fato de haver casos de subnotificação, somada a questão de que alguns pacientes com lesões incipientes no lábio inferior, muitas vezes procuram atendimento particular, ou outros ambientes hospitalares, muitas vezes subestimando as lesões que aparecem nessa região anatômica, já que uma alta incidência de CEL é esperada em cidades com climas tropicais. Sob outro aspecto, deve-se ainda considerar que o estado do Amazonas possui barreiras geográficas e uma logística difícil restringindo o acesso a tratamento adequado e viável aos pacientes, ainda tendo agravante encontrado na época da vazante quando muitas cidades ficam isoladas, sem meio de transporte e conseqüentemente sem possibilidade de locomoção a outras cidades. Dessa maneira, é fundamental o aprofundamento de estudos nessa área, além da criação de políticas que atendam as especificidades da região. Ainda nessa linha, a casuística em relação às QAs foi bastante reduzida e deve-se levar em consideração que os sinais da QAs podem ser sutis e avaliadas primeiramente pelo clínico para sua resolução, não requerendo, de maneira

decisiva, necessariamente a biópsia para seu diagnóstico, por consequência, fazendo com que o material se torne escasso (BALASSIANO 2004).

O carcinoma epidermóide de lábio é um problema de saúde pública encontrado em vários países ao redor do mundo, e existe uma escassez de dados a respeito da sua incidência na região Norte do Brasil, semelhante aos dados encontrados por Ono (2011). Pacientes caucasianos, cabelos loiros ou ruivos e com pouca capacidade de bronzeamento e que estão diretamente relacionados à exposição solar prolongada são considerados pacientes de risco para o surgimento de qualquer lesão acometida em pele, devido à radiação ultravioleta como a queratose solar, queilite actínica, carcinoma de células basais em pele e o carcinoma epidermóide de lábio (KAUGARS et al., 1999; MAIN& PAVONE. 1994; SASSI et al., 2010). A grande maioria dos estudos sobre a epidemiologia dos CELs revela o principal acometimento em pele clara, porém em nossos estudos tivemos como predominância a raça parda (feoderma) de 70%(n=12), principalmente por ser a raça de supremacia no estado do Amazonas (IBGE 2010) representando 70% da população. Em nosso estudo, encontramos somente 12% (n=2) dos pacientes da raça branca. No entanto, a comparação de estudos em relação à raça no Brasil tem tido pouca relevância devido à existência de grande miscigenação racial da população brasileira (DURAZZO et al., 2005;SOUZA et al., 2011).

Classicamente o CEL tem prevalência no sexo masculino, no entanto, Kaugars et al., (1999) e Balassiano (2004) relataram o aumento da incidência de CEL na população feminina devido a maior exposição ao sol seja por motivos profissionais ou estéticos. Durazzo e colaboradores (2005) indicaram a preocupante e crescente incidência no sexo feminino em seu estudo (31,8%, n=119) realizado com 374 pacientes portadores de câncer bucal. Em conformidade também com o resultado do presente estudo em que o CEL foi mais frequentemente encontrado em mulheres do que em homens, Marochio et al. (2010) realizaram um levantamento o qual mostrou um aumento na incidência do CEL nas mulheres

nas últimas duas décadas, atribuindo a esse aumento as mudanças de hábitos como o consumo do cigarro e o álcool e o aumento também da expectativa de vida. O fato do aumento da incidência no número de mulheres pode ser considerado real devido a mudança social e econômica da população na qual as mulheres começam a trabalhar fora, seja na cidade ou até mesmo no campo, passando a obter menos tempo para seus cuidados, aliada a exposição a ambientes que não possuem proteção. Outro fator que pode favorecer o aumento da incidência do CEL em mulheres pode estar relacionado ao conceito da estética feminina brasileira, o qual exige exposição corporal bronzeada, conseqüentemente aumentando sua exposição a incidência aos raios solares como também as câmaras de bronzeamento artificial.

A principal localização do CEL é o lábio inferior em relação ao superior, devido à projeção da incidência solar nessa área (VISSCHER et al., 1998, KORNEVS et al., 2005; PEREIRA-FILHO et al., 2011; SOUZA et al., 2011). Nossos estudos estão de acordo com os encontrados na literatura, pois encontramos 67% dos casos de CEL, presentes também no lábio inferior. Segundo Antunes et al., (2004) quando há acometimento no lábio superior existe uma predileção para o sexo feminino, o que não aconteceu em nosso estudo, apesar da maioria dos pacientes ser do sexo feminino conforme mencionado anteriormente.

A mudança das alterações induzidas pelo sol que leva ao acometimento do câncer labial é vista no decorrer dos anos, levando em média de 20 a 30 anos, podendo surgir em um período menor em alguns casos (KAUGARS et al., 1999). Antunes e colaboradores (2005) ressaltaram que o acometimento de tal lesão tem predileção pela 5^o, 6^o e 7^o década de vida. A idade média de pacientes segundo Pereira - Filho et al. (2011) e Souza et al. (2011) é de 60,6 anos e todos os casos relatados entra em concordância com o presente estudo que demonstrou uma maior ocorrência em pacientes acima de 60 anos com idade média de 54,75 anos.

A graduação histológica utilizada para o CELs no presente estudo foi a da OMS (2005) e se mostrou de acordo com os objetivos a serem alcançados. O câncer de lábio possui

evolução mais lenta e tardia, e de certa forma considerados menos agressivos sendo observado o padrão bem diferenciado e moderadamente em maior incidência que o pouco diferenciado (BALASSIANO 2004). Quanto à graduação histológica das lesões encontradas 64,70% foram bem diferenciados mostrando conformidade com outros estudos e principalmente com o estudo realizado no mesmo centro de referência em Oncologia do Amazonas por Ono (2011). Souza et al (2011) mostraram que o CEL possui baixo potencial de metástases cervicais e a cirurgia é quase sempre o tratamento de escolha, com nível de sucesso alto dentre outros fatores. Em nosso estudo foram encontrados poucos casos com envolvimento linfonodal e metástases, contudo não são dados absolutos visto que na maioria dos prontuários tal informação não foi encontrada.

Relatos na literatura entram em controvérsia quanto à expressão de algumas proteínas durante a progressão tumoral, enquanto alguns demonstram seu aumento em displasias e carcinomas (KANNAN et al., 1998; TANDA et al., 2000; CHEN et al., 2000; BALASSIANO 2004) outros relatam pouca ou ausência de expressão nessas lesões (BIRCHAL et al., 1997; PIATELLI et al., 2002; COSTA 2010; SOARES, 2005), de maneira que é necessário um melhor esclarecimento em relação ao perfil de expressão de proteínas específicas no câncer, o que vai depender do classe a que elas pertencem e ao tipo de lesão em questão.

Analisando a expressão da proteína Bcl-2 em pacientes portadores de CELs foram observadas positividade em 42,8% (n=6), sendo 60% (n=3) moderadamente diferenciados (MD), havendo 66,6% (n=4) de marcação em cordões de células neoplásicas. Grande parte dos casos selecionados (83,3%) apresentou marcação em até 25% de células. Dois casos infelizmente foram excluídos do total sendo um deles por não apresentar marcação no controle interno da reação (infiltrado inflamatório) e outro por haver marcação muito fraca não havendo confiabilidade desse possível caso negativo. Essa proteína apresentou marcação fraca e moderada.

Em QAs a proteína Bcl-2 apresentou 75% (n=3) de positividade, localizando sua marcação em 100% (n=3) na camada basal. A maioria dos casos 50% (n=2) apresentou marcação entre 51% a 75% de células. Na LRs, 100% (n=5) foram positivas para Bcl-2 e todas encontradas na camada basal, apresentando localização de 75% (n=3) entre 51% a 75% de células marcadas, foi estudado um universo de cinco amostras, pois houve exclusão de um caso. Quando comparado a imunomarcação dos CELs em relação à QAs foi observada diminuição tanto de positividade quanto de porcentagem de células marcadas e o mesmo ocorrendo em relação às LRs. As LRs apresentaram maior expressão positiva do que QAs e, em relação à localização não houve diferença, pois todas obtiveram localização na camada basal.

Costa (2010) que estudou um universo de 40 casos incluindo queilites actínicas e carcinomas epidermóides de lábio observou que a proteína Bcl-2 apresentava expressão apenas citoplasmática e um grande número de casos de CELs apresentavam-se negativo para essa proteína (26/60) e nenhum caso foi obtida marcação em mais que 50% de células. No grupo das queilites actínicas observou uma frequência grande de positividade e todas confinadas na camada basal. No grupo, o qual foi chamado de epitélio normal, 100% obtiveram marcação positiva e também confinados a camada basal.

Em nosso estudo, em CELs, dos cinco casos MD visualizamos marcação em três e somente dois bem diferenciados (BD) tiveram marcação de um universo de oito analisados para este marcador, ou seja, foi notada uma predileção para expressão dessa proteína em casos MD. Como para estes casos, de acordo com a OMS (2005) é visualizada uma ocorrência de cordões de células neoplásicas, acreditamos que por esse motivo teve predomínio desse marcador nessa específica área histológica, entrando em conformidade com Balassiano (2004) o qual realizou um estudo comparativo das proteínas Bcl-2, p53, caspase3 e ki67 em hiperplasias fibrosas inflamatórias, queilites actínicas e carcinoma epidermóide, de lábio

inferior, obtendo 20 amostras de cada grupo e visualizou o percentual médio de área positivas para o p53 e Bcl-2 maior nos casos MD. Piatelli et al., (2002) analisando a imunexpressão em epitélio normal, lesões pré- malignas e lesões malignas da cavidade oral indicaram maior expressão em moderadamente diferenciados (MD) (20,8%) e pouco diferenciado (PD) (24,2%), em relação ao epitélio normal. Observaram maior incidência em células da camada basal tanto em epitélio normal como também em displasias, sendo neste último, observada raras células na camada parabasal.

Singh et al., (1998) Avaliando imunistoquimicamente a oncoproteína bcl-2 em displasia bucal e carcinoma com lesões pré-neoplásicas incluindo displasia leve (25 casos), moderada (25 casos), e grave (25 casos) (incluindo carcinoma in situ), e carcinoma de células escamosas (60 casos) afirmaram que a expressão dessa oncoproteína foi diretamente proporcional com a diminuição da displasia epitelial, ou seja, foi observado um aumento na expressão dessa proteína na progressão das displasias epiteliais e uma diminuição na diferenciação dos carcinomas orais. Esses achados sobre a expressão do Bcl-2 em diferentes carcinomas sugerem o papel desse marcador em estágios iniciais da progressão de tumores orais. Ainda Singh et al., (1998) e Garcia et al., (2006) levantaram a possibilidade de que as alterações do bcl-2 precedem o aparecimento de lesões pré- neoplásicas para neoplásicas.

O objetivo do organismo é alcançar um equilíbrio entre proliferação celular e morte e um dos principais fatores, senão o principal é a investigação dessas alterações que induzem ao câncer. Nas lesões malignas, como também no desenvolvimento da mesma, espera-se encontrar um grande desequilíbrio. O carcinoma epidermóide labial neste estudo apresentou uma baixa expressão de Bcl-2, seguidas de QAs e obtendo uma maior expressão em LRs quando comparados aos casos negativos, o que sugere que os mecanismos de apoptose parecem estar preservados já que o fator anti-apoptótico que induz a morte programada da célula e aumenta a proliferação e o crescimento desse tumor encontra-se em níveis baixos.

Martinez et al., (2005) estudando a expressão da apoptose e regulação das células de proliferação em QAs, observaram alta expressão de Bcl-2 nessas lesões. Da mesma forma, concluindo que o processo de apoptose nas QAs está preservado entrando em conformidade com nossos estudos o qual verificamos também elevada taxa de Bcl-2 em QAs.

O declínio da expressão da proteína Bcl-2, vindo de lesões reativas, seguidas por QAs até carcinoma epidermóide de lábio sugere que a proliferação, que a princípio deveria estar aumentando em relação à progressão neoplásica não ocorre, podendo ser necessários outros estudos que abordem diferentes proteínas do ciclo celular para melhor explicação.

Analisadas as expressões da p16^{INK4a} foi observada expressão positiva em 68,7% e destes 63,6% (n=7) eram bem diferenciados predominando marcação em pérolas de queratina (43,7%, n=7) massas, lençóis e ilhas de células neoplásicas (37,5%, n=6). O predomínio de marcação foi em até 25% de células marcadas (72,7%). Esse marcador apresentou coloração fraca, somente citoplasmática, não exibindo em nenhum dos casos marcação nuclear.

Em QAs essa proteína apresentou 75% de positividade, localizando sua expressão em 75% na camada basal. Foi expressa em 66,6% entre 26% a 50% de células. Nas LRs, 75% (n=4) obtiveram positividade igual às QAs e 50% em todas as camadas. A quantidade de células marcadas foi variável.

Quando comparado a imunomarcação dos CELs em relação à QAs foi observado um declínio tanto de positividade quanto em porcentagem de células. Não houve possibilidade de compará-la com as LRs quando se refere à porcentagem de células marcadas, por estas terem sido bastante variadas não apresentando uma porcentagem majoritária que a definisse. Tanto QAs quanto as LRs apresentaram mesma porcentagem de expressão e o mesmo número de amostras.

Klaes et al. (2001) analisaram a superexpressão do p16^{INK4a} em células com displasias e neoplasias do cérvix uterino, considerando tanto marcação citoplasmática como nuclear,

porém, em todas as análises houve uma marcação forte e exclusivamente citoplasmática em nenhum dos casos foi observado marcação nuclear e sugeriram que essa proteína é de fato superexpressa em células transformadas de alguns tipos de HPV. Yonamine et al., (2009) utilizando amostras de neoplasias intra-epiteliais cervicais tratadas, porém com recorrência, considerou três tipos de marcação: núcleo e citoplasma, somente citoplasmas e somente núcleo. Silva et al. (2011) observaram uma coloração amarronzada intensa predominantemente observada no núcleo, com ou sem coloração citoplasmática e este foi seu parâmetro para designação de positividade para a expressão da p16^{INK4a}. Dragomir et al., (2012) em seus estudos sobre p53, p16^{INK4a} e Ki 67 avaliou tanto marcação citoplasmática quanto nuclear para p16^{INK4a}. Em nossos estudos não foi encontrada nenhuma marcação nuclear, somente citoplasmática.

Um processo de múltiplas etapas, com associação ao acúmulo de sucessivas alterações genéticas em oncogenes como genes supressores do tumor, faz com que as células sofram transformações de células normais para malignas, sendo causadas por irregularidades em vários reguladores, tanto positivos como negativos do ciclo celular. Várias ciclinas e cinases dependentes de ciclina regulam positivamente o ciclo celular e negativamente por um número de inibidores de cinases dependentes de ciclina incluindo o p16^{INK4a} (ROBBINS & CONTRAN 2005; CRUZ et al., 2011).

YANG et al.(2002) estudaram 69 casos de carcinoma de lábio e carcinomas epidermóides orais para a detecção da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) bem como o seu significado clínico-patológico. A expressão da proteína p16^{INK4a} foi de 28, 9% e concluiu não haver correlação entre os fatores estudados.

Guerra et al., (2005) avaliaram a expressão da ciclina D1 e p16^{INK4a} em carcinomas epidermóides bucais de 34 amostras e observaram expressão em 22, 3% (n=7) destas,

presumiram então que, sendo o p16^{INK4a} um gene supressor de tumor, poderia ele estar inibido nesses carcinomas. Porém, uma provável explicação para o número aumentado de células que expressam o p16^{INK4a} durante a carcinogênese neste estudo seria a proliferação epitelial e a consequente transformação resultar do acúmulo de p16^{INK4a} aberrante. É importante salientar que para este estudo foi considerada marcação nuclear do p16.

Queiroz et al. (2009) estudando um grupo de 32 casos de epitélio escamoso normal, 30 casos de carcinoma de células escamosas e 34 casos de carcinoma de células escamosas da cavidade oral observaram que p16^{INK4A} obteve imunopositividade focal em 100% para os grupo controle e papiloma escamoso e 94% para o grupo carcinoma de células escamosas.

Ainda Gotia- Durán et al. (2010) estudando adenocarcinoma da cabeça do pâncreas e sua relação com a sobrevida e diferenciação celular constataram superexpressão da proteína p16^{INK4a}, porém não conseguiram relacionar com a sobrevida ou ao grau tumoral quando se compararam as expressões isoladas ou combinadas.

Dragomir et al., (2012) Avaliando a expressão do p53, p16^{INK4a} e Ki67 em 34 amostras de pacientes portadores de carcinoma epidermóide oral considerando três áreas e suas respectivas percentagem de positividade: tumor (35,1%), *front* invasivo (27%) e epitélio displásico (45,4%) e concluíram que as reações para a proteína p16^{INK4a} tiveram um grande aumento nas células displásicas adjacentes ao tumor e reduzido nos tumores invasivos, para tanto, concluiu que a investigação do p16^{INK4a} é de utilidade na identificação de lesões displásicas e que a diminuição da sua expressão constitui um fator de previsão para transformação maligna dessas lesões.

A hiperexpressão do p16^{INK4a} tem sido relacionada à melhor prognóstico para carcinoma de células escamosas, pois, em área tumoral sugere que não houve hipermetilação do gene CDK2N que normalmente codifica essa proteína. A maioria dos carcinomas escamosos de esôfago apresentam hipermetilação desse gene e por isso 50% a 70 % não

expressam a proteína p16, sendo considerado por isso, um fator de pior prognóstico (FUJIWARA et al.2006; LOURO 2002 et al). Hall et al. (2008) estudaram a metilação do p16^{INK4a} como um potencial para transformação maligna em displasias epiteliais orais e concluíram que o p16^{INK4a} promovendo a metilação promete como um marcador diferenciando entre a estabilidade e transformação de displasias epiteliais orais em neoplasias.

Mortier et al. (2002)fazendo uso de 10 casos de carcinoma de pele e 12 de queratose actínica para realização da imunoistoquímica estudaram a progressão de queratose actínica para carcinoma de células escamosas da pele investigando a integridade da região 9p21 contendo o gene CDKN2A e correlatos com a expressão. Foi determinado que, ao contrário do carcinoma epidermóide de pele, as queratose actínicas são lesões relativamente livres de alterações genéticas na região 9p21. Concluíram que seus dados fornecem fortes evidências de que a progressão molecular envolve alterações que levam à inativação do p16^{INK4a} pela alteração do gene que codifica essa proteína (CDKN2A). Contudo, o câncer de lábio não segue os mesmos padrões que o carcinoma espinocelular da pele, a neoplasia no lábio tem maior probabilidade de desenvolver metástase, com taxa variando de 3% a 20%, porém, é considerado de melhor prognóstico quando comparado ao câncer oral (LAWS et al., 2000; PISCASCIA et al., 1987).

Cruz et al. (2011) utilizando 23 amostras de carcinoma epidermóide da cavidade bucal procurou verificar o perfil de metilação do gene p16 e concluiu que (17,4%) tiveram frequência de metilação na região promotora do gene e que o envelhecimento pode estar associado a metilação desse gene. Hall et al. (2008) com um número de amostra de 100, originadas de 14 participantes, para carcinoma epidermóide oral e 184 de 24 participantes para displasia oral observaram que 26% do grupo de 100 apresentavam metilação do gene e apenas 2 do grupo das displasias foram positivos para essa alteração mostrando a baixa frequência de metilação para o grupo dos carcinomas.

Estudo da proteína p16^{INK4a} tanto em sua expressão como em anormalidades cromossômicas, vem sendo difundida como mais uma ferramenta de pesquisa no processo de progressão do câncer nas neoplasias humanas especialmente nas de cérvix uterina, onde tem sido amplamente estudada. Em lesões de malignas e pré- malignas da cavidade oral tem sido observado um declínio dessa expressão na progressão da lesão. Entretanto essa proteína não tem obtido resultados uniformes e sua superexpressão tem sido relatada em alguns cânceres de cabeça e pescoço, como também especificamente na cavidade oral (HAYAMA 2006; QUEIROZ et al., 2009). A superexpressão da p16^{INK4a} não é um achado suficiente para diferenciar células atípicas e aquelas encontradas em metaplasia imatura benigna (SILVA et al., 2011).

Em nossas amostras encontramos um maior percentual de expressão positiva do que negativa para essa proteína e alguns autores nessa linha tiveram resultados similares em suas pesquisas (Klaes et al., 2001, Queiroz et al. 2009, Gotia- Durán et al., 2010). Vale ressaltar que não foi objetivo do presente estudo verificar a frequência de metilação do p16^{INK4a}, porém nos direciona ao pensamento de que há processos biológicos que conjuntamente e independentemente estão presente e atuando nas alterações que induzem ao processo tumoral. A expectativa do estudo de uma proteína supressora de tumor p16^{INK4a} em CELs era a de serem encontradas em baixos níveis, contudo, foi observada uma maior expressão. Quando considerados alguns trabalhos envolvendo a cavidade bucal referente à metilação do gene CDKN2A que codifica a proteína em questão, foram observadas uma baixa frequência (CRUZ et al., 2011 e HALL et al. 2008).

Nos casos das queilites actínicas todos tiveram um grau de maior que 25%, porém, diferente da encontrada para Bcl-2, apenas um obteve marcação somente da camada basal e o restante obtiveram marcação tanto da camada basal como suprabasal. As lesões reativas do lábio tiveram em sua maioria marcação acima de 50% e visualização em todas as camadas,

sugerindo que quando há evolução de epitélio normal para displasias a expressão do p16^{INK4A} na medida em que a lesão começa a ter comportamento displásico as células começam a se depositar na camada basal.

Analisando a imunoexpressão da ciclina D1 (CD1) em pacientes portadores de CELs foi visualizada em 37,5% (n=6) positividade para essa proteína e, destes, 45,4% (n=5) eram bem diferenciados, havendo 100% de marcação em cordões de células neoplásicas, seguidas por lençóis massas e ilhas e pérolas (50%). Grande parte dos casos (66,66%) apresentou marcação em até 25% de células. Essa proteína apresentou marcação nuclear forte, com pouca variação. Foi visualizada marcação citoplasmática somente em uma amostra de CELs de lábio no epitélio adjacente à lesão.

Em QAs a ciclina D1 apresentou 75% (n=3) de positividade, localizando sua marcação em 75% na camada suprabasal. Grande parte dos casos (50%) apresentou marcação entre 26% a 50% de células marcadas. Nas LRs 60% (n=3) foram positivas para ciclina D1 apresentando localização de 66,6% (n=2) na camada suprabasal. No total 100% (n=3) obtiveram marcação de 51% a 75% de células.

Quando comparado a imunomarcação dos CELs em relação à QAs foi observada uma diminuição tanto de positividade quanto de porcentagem de células marcadas e o mesmo ocorrendo em relação às LRs. Foi observado um aumento tanto de positividade quanto de localização, ambas obtidas em maior quantidade na camada suprabasal, de LRs para QAs. Porém, a maior porcentagem de células marcadas foi maior no grupo das QAs quando comparados as LRs.

GILLET et al. (1996) em seus estudos com 345 pacientes com câncer de mama, observaram 71,8% de expressão das ciclinas nas amostras. O resultado mais importante deste estudo foi o prognóstico adverso associado à coloração negativa da ciclina D1 e a superexpressão dessa proteína associada ao carcinoma bem diferenciado. Neste estudo, foi

verificado que tumores que expressam níveis reduzidos de ciclina D1 apresentam pior resultado clínico.

Neves et al. (2004) Compararam a expressão da ciclina D1 e p21 e a graduação de malignidade em carcinoma bucais em 28 casos observaram 85,7% (n=24) principalmente expressa em camadas periféricas de ilhas de tumor. Os com menores graduações obtiveram maior marcação variando entre 0% a 10%.

Das et al. (2011) correlacionaram a ciclina D1 com 45 pacientes que apresentava carcinoma intra oral associado ao tabagismo e observou superexpressão em 66,6% de casos em idades avançadas e 78,5% dos casos eram moderadamente diferenciados.

Saawarn et al. (2012) comparando a expressão da ciclina D1 e as correlacionando com a diferenciação histopatológica em carcinoma de células orais em universo de 40 casos observou positividade em 45% (n=18) sendo 69,23% bem diferenciados e descreveu a expressão principalmente em camadas periféricas de ilhas de tumor e não em células exibindo mitose, também de acordo com seus dados, houve um aumento na expressão de ciclina D1 com o aumento da diferenciação, a mais alta expressão foi observada em carcinomas bem diferenciados seguido de moderadamente e pouco, porém, relataram que não há estudos disponíveis na literatura utilizando critérios semelhantes de comparação de diferenciação histológica para comparação de seus dados.

Huang et al. (2012) estudando a superexpressão da ciclina D1 em carcinomas epidermóide da cavidade oral, avaliou 264 taiwaneses no período de 6 anos. Em sua análise imunoistoquímica quando as células apresentavam mais que 10% de células com marcação nuclear de intensidade moderada a forte era considerada superexpressão. Houve superexpressão desta proteína em 36,7% (n=97) dos casos e destes, 66% eram moderadamente e pouco diferenciados e concluiu que seus resultados indicam que a

superexpressão da ciclina D1 foi observada em eventos iniciais da gênese do tumor e de carcinoma de células escamosas da cavidade oral.

LAM et al, (2002) estudando 56 pacientes com carcinoma epidermóides orais observou que a expressão da ciclina D1 é frequentemente visualizada em regiões de orofaringe, palato, assoalho bucal e gengiva e concluíram que a expressão teve relação com as graduações do tumor e não foi similar em várias regiões da cavidade oral o que indicaria uma diferente biologia dos tumores de câncer para essas regiões. Este fato pode ser explicado considerando-se o melhor comportamento biológico de um carcinoma epidermóide que ocorre no lábio inferior ou em qualquer outra localização intra-bucal, explicando mais uma vez a relação da maior expressão da ciclina D1 e prognóstico desfavorável. Os autores talvez não tenham observado esta diferença devido ao fato de, na maioria dos casos, não terem trabalhado com carcinoma epidermóide de lábio inferior (GUERRA et al., 2005).

Guerra et al., (2005) avaliaram a expressão da ciclina D1 e p16 em carcinomas epidermóides de 34 amostras de carcinomas, observou menor expressão de ciclina D1 para região de lábio inferior (25,8%) quando comparados a língua e outras regiões intrabucais.

A alta expressão de ciclina D1 em tumores de alto grau pode ser explicada pelas alterações na ciclina D1 serem relatadas como uma intensa atividade proliferativa e invasiva capacidade de lesão (STAIBANO et al., 1998 e NEVES et al., 2004). Em contraste, a ausência da ciclina D1 pode ser relatada quando há desregularização em outra proteína do ciclo celular (NEVES et al., 2004).

Expressão da ciclina D1 foi estudada em vários carcinomas incluindo carcinomas de células escamosas. Alguns estudos foram realizados para correlacionar a expressão da ciclina D1 com grau histológico da neoplasia. No entanto, os resultados não têm sido consistentes e conclusivos (MISHRA & DAES, 2009).

A ciclina D1 é a proteína chave na regulação da transição da fase G1-S no ciclo celular (Sherr, 1995), estando presente no início da formação do carcinoma e envolvida no desenvolvimento e crescimento tumoral, estando relacionado com o crescimento local do carcinoma (GUERRA et al., 2005). Em nossos estudos, a percentagem da expressão da proteína CD1, foi menor comparando com os casos negativos, sugerindo que, por ser uma proteína de expressão proliferativa celular, em nossas amostras, encontramos em baixos níveis e em maior percentagem em CELs bem diferenciado o que se assemelha com os dados de Saawarn et al (2012). Supõe-se que tais carcinomas não estariam mais em grande atividade mitótica e em um maior grau de diferenciação celular, com provável prognóstico favorável.

Comparando CELs com QAs e LRs verificou-se uma maior percentagem para QAs e LRs, indicando que a lesão parece está com atividade proliferativa. Quando comparadas, QAs e LRs verificou-se uma maior quantidade no grupo das QAs e ambas com maior incidência na camada suprabasal. Sabendo que as QAs são consideradas lesões com um alto potencial de malignização (VAN DER WAAL et al., 2009) que frequentemente antecede o aparecimento do CELs (CATALDO; DOKU, 1981; MARKOPOULOS et al., 2004) pode-se sugerir uma variação de lesão para carcinoma onde temos um “pico” de expressão da CD1 em QAs. Contudo, há necessidade de estudos com uma maior casuística para indicação da CD1 como fator prognóstico em CELs.

Ao analisarmos a expressão das três proteínas nas amostras de pacientes acometidos de CELs conjuntamente observamos que a expressão da proteína Bcl-2 quando comparada ao p16^{INK4a} demonstrou percentuais proporcionalmente contrários. Estudos de Guerra e colaboradores (2005) avaliando o papel do p16 e da CDK4 na regulação do ciclo celular revela que a proteína p16 se liga a CDK4 e forma o complexo p16-CDK4, impedindo a fosforilação do pRB. O pRB, hipofosforilado, mantém-se supressor de tumor. Por outro lado, no caso de disfunção do p16, a CDK4 pode ligar-se à ciclina D e formar o complexo CDK4-

ciclina D. Este complexo promove a fosforilação do pRB e libera o fator de transcrição (TF), o qual acelera o ciclo celular. Em nosso presente trabalho a expressão do p16^{INK4a} em CELs comparada com os casos negativos nos mostra um alto índice de expressão (68,7%), como essa proteína é um regulador negativo do ciclo celular, impedindo que a fase G1 prossiga para fase S, pode ser esperado que em lesões de CELs com expressões aumentadas dessa proteína tenha um índice de proliferação baixo.

Nas amostras de pacientes portadores de QAs tanto para a proteína p16^{INK4a} quanto para Bcl-2, não houve diferenças em percentual e estatísticas e ambas encontravam-se em maior porcentagem (75%) na camada basal. Em relação às LRs, a proteína Bcl-2 obteve maior expressão (100%) que a proteína p16^{INK4a} (75%), havendo uma diferença em localização, sendo 100% na camada basal para Bcl-2 e 66,6% em todas as camadas para p16^{INK4a}.

No presente estudo, em amostras de pacientes portadores de CELs, foi observado que a expressão da proteína Bcl-2 foi similar a ciclina D1, alguns exemplos dessa similaridade são transcorridos no decorrer do estudo: maior expressão encontrada em cordões de células neoplásicas (apesar de não apresentar significância estatística) e baixos níveis de expressão quando comparados aos casos negativos. É sabido que a proteína Bcl-2 é uma proteína anti-apoptótica, relacionada com a inibição da apoptose e seu papel na transformação neoplásica é impedir ou ainda, regular a morte celular programada e, no entanto, no presente trabalho observamos baixos níveis quando comparados aos casos negativos, baixa proliferação celular. Quando verificada a expressão da ciclina D1, fator de proliferação celular, observa-se maior visualização em cordões de células neoplásicas e em casos bem diferenciados, apesar de não apresentar diferença estatística para os dois casos em questão, porém sugere que nas amostras de pacientes portadores de CELs não estão presentes um índice proliferativo exacerbado. Ainda, se não foi observado um índice elevado de proliferação celular supõe-se que não haveria também um fator anti-apoptótico com níveis também elevados. Nas amostras de

pacientes portadores de QAs quando comparado à expressão da proteína Bcl-2 e ciclina D1 verificou-se uma expressão similar, tanto em QAs de Bcl-2 como de CD1 (75%), no entanto a primeira com 75% de localização na camada basal e a segunda também com 75%, porém na camada suprabasal.

No presente estudo foram observadas expressões antagônicas para Ciclina D1 e p16^{INK4a}. A expressão em pacientes portadores de CELs do p16^{INK4a} foi relativamente alta quando comparado aos casos negativo e por sua vez, e como já dito anteriormente, a expressão da ciclina D1 foi visualizada em baixos níveis. Vários estudos avaliam a expressão desses dois marcadores pelo fato da íntima relação em uma mesma “cascata” de eventos.

Lin et al., (2006) avaliaram a expressão do p16^{INK4a} em 27 amostras de pacientes que foram submetidos a nasofaringectomia de carcinomas nasofaríngeos (CNF), que tiveram recorrência por falha nos tratamentos com quimioterapia e radioterapia, o nível de expressão de p16^{INK4a} em amostras de (CNF) recorrentes foi muito mais baixa do que a relatada para os casos não tratado previamente. A constatação de que a quase totalidade (96%) da expressão de repetição do (CNF) e a baixa expressão do p16^{INK4a} sugere que a perda desta proteína pode conferir uma vantagem de sobrevivência para as células, as tornando mais resistentes ao tratamento convencional com radioterapia e quimioterapia.

Sabendo da concorrência dessas proteínas no ciclo celular, a ciclina D1 como fator de proliferação e o p16^{INK4a} como regulador negativo do ciclo celular, nos leva ao conhecimento que a maior expressão do p16^{INK4a} está levando a uma menor expressão da ciclina D1 e o contrário também é verdadeiro.

Comparando a expressão dessas duas proteínas em amostras de pacientes portadores de CELs e amostras provenientes de pacientes com QAs, foi observado uma mesma porcentagem para células marcadas (75%), porém em diferentes localizações, expressão do p16^{INK4a} em 75% na camada basal e para ciclina D1 a mesma porcentagem, porém na camada

suprabasal. Em amostras de LRs, a expressão da proteína p16^{INK4a} foi de 70% sendo maior que a expressão da ciclina D1 de 60%, sendo 66,6% localizadas em todas as camadas como também a mesma porcentagem para ciclina D1 com prevalência na camada suprabasal.

A indicação para utilização dos marcadores utilizados no presente trabalho, para aplicação em prognósticos em lesões malignas da patologia bucal ainda necessita de mais estudos e de uma casuística maior, sugere-se também a utilização também de outros marcadores e outras ferramentas conjuntas, como processos de metilação para avaliação da proteína p16^{INK4a}.

A evolução e o comportamento das lesões pré-malignas estão diretamente relacionados com o desequilíbrio entre proliferação e morte celular e muitas vezes as características clínicas e morfológicas subestimam determinadas lesões e se fazem cada vez mais necessários mais ferramentas que possibilitem a identificação de fatores prognósticos. A identificação de marcadores imunohistoquímicas e a expressão de genes de proliferação e morte celular tem se tornado de grande importância e de aplicabilidade clínica para carcinogênese bucal (BALASSIANO 2004).

Os resultados não demonstram diferença estatisticamente significativa no presente estudo em relação à marcação da ciclina D1 e alguns dados dos demais marcadores também não revelaram significância, acreditamos que um fator potencial foi devido à baixa casuística encontrada para este estudo.

Combinações de marcadores imunohistoquímicos, graduação histológica e identificação de padrões arquiteturais nos carcinomas epidermóides aliados à análise clínica dessas patologias parecem ser de grande relevância para compreensão do processo de carcinogênese, sendo encontrados na literatura, escassos estudos em relação ao carcinoma epidermóide bucal, principalmente o labial.

7. CONCLUSÃO

- Sugere-se que a proteína p16^{INK4a} esteja relacionada com grau de diferenciação celular já que sua expressão foi encontrada predominante em pérolas de queratina e raramente em células isoladas.
- Sugere-se que a expressão da proteína Bcl-2 esteja diminuída em carcinomas epidermóides de lábio em relação às lesões reativas, consideradas, sob o ponto de vista neoplásico, tecidos normais, estando nestes, expressa de maneira mais espalhada.
- Sugere-se que a expressão da proteína Bcl-2 ocorra de maneira mais localizada em CELs em relação aos tecidos “normais”, estando nestes, expressa de maneira mais espalhada.
- Sugere-se que a expressão da proteína p16^{INK4a} ocorra de maneira mais localizada em CELs em relação às QAs, estando nestas, expressa de maneira mais espalhada.
- Sugere-se que a expressão das três proteínas entre si no CEL ocorra de maneira que Bcl-2 e ciclina D1 estejam diminuídas e a p16^{INK4a} esteja aumentada nessas lesões.
- De acordo com a graduação histológica do CEL, houve maior predominância do tipo bem diferenciado sugerindo melhor prognóstico para essas lesões.
- Carcinomas epidermóides com diferentes graduações histológicas podem apresentar padrões arquiteturais semelhantes cuja predominância é relevante para diferenciação de sua graduação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNEROTH G., HANSEN L. S. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. **Scand J Dent Res.** v.92, p.448-68, 1984.

ANTUNES et al. Estudo retrospectivo e revisão de literatura dos tumores dos lábios: experiência de 28 anos, v. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 4, p. 295-300, 2004.

ARISAWA, E.A.L.; MORAES, E. P.C.A.N. A and Ki-67 cells cycle makers: A brief review. Pós Grad. **Rev. Facul. Odontol. São José doa Campos**, v. 2, n. 1, p. 54-60, 1999.

BALASSIANO, K. Z. **Estudo comparativo da expressão imunoistoquímica das proteínas Bcl-2, p53, caspase-3 e Ki 67 em hiperplasias fibrosas inflamatórias, queilites actínicas e carcinomas de células escamosas do lábio inferior.** Niterói, UFF: 2004, Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal), Universidade Federal Fluminense, 2004.

BÁNOCZY, J. CSIBA, A. Occurrence of epithelial dysplastic in oral mucosa. **Oral Surg.**, v. 42, n. 6, p. 766- 774, 1976.

BARNES, L., EVESON, J.W., REICHART, P., SIDRNSKY, D., editors. World health organization classification of tumours- pathology and genetics of head and neck tumors. **Lyon: IARC Press**, v. 4, p.163-208, 2005.

BERNARDS R. **Cell cycle regulation and cancer.** Disponível em: <<http://streaming.cineca.it/sestri/courses/cancgen/Bernards.htm>>. Acesso em: 29 agos. 2012.

BIRCHAL M. A. et al., Apoptosis in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of the oropharynx and oral cavity: a preliminary study. **Eur. J. Câncer B. Oral Oncol.** v.31, n.6, p.380, 1995.

BRANDÃO, L. G. CAVALHEIRO, B. G., SONDERMANN, A. A apresentação clínica e estadiamento. In: Parise Jr **O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos.** São Paulo, ed. Savier. v. 10, p. 71-9, 2000.
Hansen.

BRASIL. Ministério da saúde. Instituto nacional do câncer - INCA. **Falando sobre câncer boca boca.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/publicacoes/falando_sobre_cancer_boca_boca.pdf>. Acessada em: 3 jul. 2010.

BRYNE M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Bryne M. Oral Dis.**, v.4, n.2, p.70-7, 1998.

BRENER, S.; JEUNON, F.A.; BARBOSA, A.F. GRANDINETTI, H.A.M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão da literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Rev Bras. Canc.** v.53, n.1, p.63-9, 2007.

CAPELOZZI V. L. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão-Role of immunohistochemistry in the diagnosis of lung cancer, **J. Bras. Pneumol.** v.35, n.4, 375-382, 2009.

CATALDO E. DOKU H.C. Solar Cheilitis. **J Dermatol. Surg. Oncol.** V.7, n. 12, p. 989-95, 1981.

CHEN, Q.M.; LUO, G.; SAMARANAYAKE, L. P. Expression of p16 and CDK4 in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinoma: a semi-quantitative immunohistochemical study. **J. Oral Pathol. Med.** v. 28, p.158-64, 1999.

CHIANG, W. F. et al. Overexpression of galectin-1 at the tumor invasion front is associated with poor prognosis in early stage oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 44, n. 4, p. 325-34, 2008.

COSTA. **Estudo da mutação do gene TP53 e análise da expressão imuno- histoquímica de p53, Bcl-2 e Faz em queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio**, São Paulo, USP: 2010. Dissertação de Doutorado, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2010.

CRUZ, M. V. et al. **Perfil de metilação do gene p16 em mucosa oral de indivíduos com carcinoma epidermóide da cavidade oral.** Disponível em: http://www.sumarios.org/sites/default/files/pdfs/06_analise_do_perfil_de_metilacao_p16_corr_igido_25-10-11.pdf Acesso em: 20-08-2012.

DIAS, Renata Helena Ferreira Caraméz Pierroni. **Análise do fenômeno da imunotolerância na fotocarcinogênese em lábio.** 2011. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucal) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23141/tde-06032012-165809/>>. Acesso em: 26 agost. 2012.

DORNELAS M. T. Expressão de marcadores de proliferação celular e apoptose no carcinoma espinocelular de pele e ceratose actínica, **Na. Bras. Dermatol.** v. 84, n. 5, p. 469-75, 2009.

DRAGOMIR et al. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. **Rom. Morphol. Embyol.**v. 53, n. 1, p. 89-93, 2012.

DURAZZO M. D. et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. **Clinics (Sao Paulo).** 60, n.4, p. 293-8, 2005.

FERRAZZO, Kivia Linhares. **Estudo da Expressão imunoistoquímica da proteína galectina-3 B Catenina, e ciclina D1 em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares.** São Paulo: USP, 2008. Tese de doutorado. 86p. São Paulo, 2008.

FIGUEIREDO L. C. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.49, n.3, p.179-183, 2003.

FUJIWARA S. et al. Hypermethylation of p16 gene promoter correlates with loss of p16 expression that results in poorer prognosis in esophageal squamous cell carcinomas. **Diseases of the Esophagus**, v.21, p.125–131, 2008.

GARCIA G. V. et al. Bases moleculares del cáncer oral. Revisión bibliográfica. **avances en odontostomatología**, v. 21, n. 6, 2005.

GERSCHE, F. J.; GERSCHENSON, L. E. The biology of apoptosis. **Hum. Pathol.**, v.32, p.1029-38, 2001.

GILLET, C. et al. Cyclin d1 and prognosis in human breast cancer. **Int. J. Cancer Pred. Oncol.** v.69, p.92-99, 1996.

GOTIA-DURÁN M. B. Expressão das proteínas p53, p16 e ki67 no adenocarcinoma da cabeça do pâncreas e sua relação com a sobrevida e diferenciação celular. **Estim**, v. 8, n. 4, p. 444-448, 2010.

GOMES, A. P. N.; ARAÚJO, V. C.; PINTO JR, D. S. Análise imuno-histoquímica de p53 e PCNA como marcadores de risco para lesões bucais potencialmentemalignas. **RPG Rev Pós Grad**, v. 7, n. 4, p. 349-355, 2000.

GUERRA, E. N. S. et. al. Expressão imunoistoquímica da ciclina D1 e do p16 em carcinoma epidermóide de boca: correlação com sistema TNM e localização. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 5, n.1, p.31-37, 2005.

HALL et al. P16 promoter methylation is a potential predictor of malignat transformation in oral dysplasia. **Câncer Epidemiol. Biomarkers**, v. 17, p. 2174-2179, 2008.

HAYAMA F. H. **Estudo da Expressão do p16 em líquen plano bucal**. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Tese de doutorado, 2006.

HONJO, Y. et. al. Expression on cytoplasmic galectin-3 as a prognostic maker in tongue carcinoma. **Clin. Cancer Rev.**, v.6, p.4635-4640,2000.

HUANG S. F. et al.Cyclin D1 overexpression and poor clinical outcomes in Taiwanese oral cavity squamous cell carcinoma. **Worlds Journal os Surgical. Oncology**, v. 10, n. 40, 2012.

INCA – Instituto Nacional do Câncer: **estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>> 4 jul. 2011.

INCA – Instituto Nacional do Câncer: **estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>>, 2008.

IBGE. **Caraterísticas étnico raciais da população** – Um estudo das categorias de cor ou raça, 2008.

IZZO, J.G. et al. Cyclin D1 genotype, response to biochemo prevention, and progression rate to upper aerodigestive tract câncer. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 95, p.198-205, 2003.

KATO, K.; HARA, A.; KUNO, T.; MORI, H.; YAMASHITA, T.; TOIDA, M.; SHIBATA, T. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 132, n.11, p.735-43, 2006.

KANNAN, K; LAKSHMI LATHA PN; SHANMUGAM, G. Expression of bcl-2 oncoprotein in Indian oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**, v.34, n.5, p.373-376, 1998.

KAUGARS, G. E.; PILLION, T. B. A.; SVIRSKY, J. A. et al. Actinics cheilites: a review of 152 cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol Oral Radiol and Endod.*, v.88, n.2, p. 181-6, 1999.

KARP, GERALD. **Biologia Celular e Molecular** - Conceitos e Experimentos, 3ª edição, p.832, ed. Manole, 2005.

KHLEIF S.N. **Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity.** v.30; n. 93(9):4350-4, 1996.

KLAES et al. Overexpression of p16^{INK4a} as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri, **Int. J. Cancer**, v. 97, p. 276-284, 2001.

KORNEVS et al. 5 year experience with low lip cancer, **Syomatologija Baltic Dental and Maxilofacial Journal**, v. 7, n. 3, 2005

KUJAN, O. Et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, in press, v.42, p. 987-993, 2006.

HALL G. L. et al. p16 promoter methylation is a potencial predictor of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. **Cancer Epidemiol. Biomaker Prev.**, v. 17, p. 2174-2179, 2008.

HAYAMA F. H. **Estudo da expressão da P16 em casos de líquen plano bucal.** São Paulo-USP. Dissertação (Doutor em diagnóstico bucal), Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, 2005.

LAM, K. Y. et al. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinomas: clinicopathological relevance and correlation with p53 expression. **Journal of Oral Pathol. and Medicine**, v. 29, n. 4, p. 167–172, 2000.

LAWS R. A. Comparison of electrodesiccation with CO2 laser for the treatment of actinic cheilitis. **Dermatol. Surg.**, v. 26, p. 349-353, 2000.

LIBÓRIO et al, 2011 In situ hybridization detection of homeobox genes reveals In situ hybridization detection of homeobox genes reveals distinct expression patterns in oral squamous cell carcinomas. **Histopathology**, v. 58, p.225–233, 2011.

LIN H.M.; PESTELL R.G., RAZ A.; KIM H.R.C. Galectina-3 enhances cycling D1 promoter activity through SP1 and a camp-responsive element in human breast epithelial cell. **Oncogenes**; v. 21, p. 8001-10, 2002.

- LIU, F. T. et al. Intracellular functions of galectins. **Biomechanical**, v. 1572, p. 263-273, 2002.
- LORO. L. L.; VINTERMYR, O. K.; JOHANNESSEN, A. C. Cell death regulation oral squamous cell carcinomas methodological considerations and clinical significance. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 32, p. 125-38,2003.
- LOURO I. D. et al. **Genética molecular do câncer**. 2nd, ed. São Paulo, p. 63-90, 2002.
- LUNA-ORTIZ K. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. **Oral Oncol.** v. 40, n.10, p. 992-9, 2004
- MAAHS, G. S.; Expressão de ciclina D1 e presença de metástase cervical de carcinoma epidermóide de boca. **Rev. Bras. Otorrinolaringol**, v.73, n.1, p. 93-100, 2007.
- MAGALHÃES, R.P., MAGALHÃES, M.H.C.G. Carcinógenos bucais. In: Parise Junior O. **Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos**. São Paulo: Sarvier, cap. 3, p.16-22, 2000.
- MAIN, J.H.P.; PAVONE, M. Actinics chelites and carcinomas of the lip. **J. Can. Dent. Assoc.**, v.60, n.2, p. 113-6, 1994.
- MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU-FARMAKI, E.; KAYAVIS I. Actinic cheilitis: Clinical and pathological characteristics in 65 cases, **Clinical Oral Medicine**, v. 10, p. 212-216, 2004.
- MAROCCHIO L. S. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1564 cases showing advances in early detection. **Journal of oral science**, v. 52, n. 2, p. 267-273, 2010.
- MARTÍNEZ, A. et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 34, p. 257–262, 2005.
- MICHALIDES, R.J. et al. Overexpression of cyclin D1 indicates poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Arch Otolaryngology Head Neck Surg**, v.123, p.497-502, 1997.
- MISHRA R. DAES B. R. Cyclin D1 expression and its possible regulation in chewing tobacco mediated oral squamous cell carcinoma progression. **Arch Oral Biol**. v. 54, n.10, p.917-23, 2009.
- MOORE S, JOHNSON N, PIERCE A. The epidemiology of mouth cancer. **Oral Dis**, v.6, p. 65, 2000.
- MORTIER L. et al. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16 (INK4a) tumor suppressor. **Cancer Letters.**, v. 176, p. 205–214, 2002.
- NAMAZIE, A., ALAVI, S., OLOPADE, O.I. et al. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. **Laryngoscope**, v.112: p.472–481, 2002.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral e Maxilo Facial**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro-RJ, 2004, 705P.

NICOLAU, S.G.; BALUS L. On the nature of Kerato acanthoma and its position among epithelial- tumors. **Oncology**, v. 17, p.120-34, 1964.

NURSE P. A long twentieth century of cell cycle and beyond cell. **Cell**, v. 100, p. 71-78, 2000.

ONO L. M. **Estudo epidemiológico retrospectivo das lesões bucais diagnosticadas na Fundação Centro e Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) entre os anos de 1998 a 2009**. Universidade Estadual de Campinas- Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2011.

OSCHENIUS, G.; ORMEÑO, A.; GODOY, L. Et al. Estudy retrospective de 2323 casos de cancer y precancer de labio em pacientes chilenos. Correlation clínico-histologica. **Rav. Méd. Chile**, v.131, n.1, p. 60-6, 2003.

OMS 2005 World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours, **Edited by Leon Barnes, John W. Eveson, Peter Reichart, David Sidransky** 430 pages, 2005.

QUEIROZ A. B. P. et al. Estudo de p27, p21, p16 em epitélio escamoso normal, papiloma escamoso e carcinoma de células escamosas da cavidade oral. **Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, n. 6, p. 481-488, 2009.

PEREA et al., Estudio inmunohistoquímico del carcinoma epidermoide de lábio, **Med Oral Patol Oral. Cir Bucal**, v.10, p.454-61, 2005.

PEREIRA-FILHO et al.. Epidemiologia do Carcinoma Espinocelular de Lábio: Experiência do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. **Ver. Bras. Cir. Craniomaxilofacial**, v.14, n. 4, p.190-193, 2011.

PERUZETO, M.M. **A presença das proteínas Hmlh1 e Hmsh6 do sistema de reparo do mau pareamento do DNA em queilites actínicas e carcinomas epidermóides de lábios**. Dissertação de mestrado. São Paulo: faculdade de Odontologia da USP, 2006.

PESTELL, R. G. The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. **Endocr. Rev.** v. 20, p.501-534, 1999.

PIATELLI A. et al. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. **J. Oral Maxillo fac. Surg.** v. 60, p.532-540, 2002.

PICASCIA, D. D., ROBINSON, J. K. Actinic cheilitis: A review of the etiology, diferencial diagnosis and treatment. **J. cad. Dermatol.**, v. 17, p. 255, 1987.

QUEIROZ et al. Estudo de p27, p21, p16 em epitélio escamoso normal, papiloma escamoso e carcinoma de células escamosas da cavidade oral. **Bras. Patol. Med. Lab.** v. 45, n. 6, p. 481-488, 2009.

ROBBINS, S.; CONTRAN, R. **Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro, ed. Elsevier, p. 300-23, 2005.

SAMAN D.M . A review of the epidemiology of oral andpharyngeal carcinoma: update **Head & Neck Oncology**, v. 4, n.1, 2012.

SANDAL Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. **The Oncologist**, v. 7, p. 73-81, 2002.

SAAWARN S. Cyclin D1 expression and its correlation with histopathological differentiation in oral squamous cell carcinoma. **The scientific World Journal**, v.2012, 2012.

SASSI et al. Caso raro de carcinoma epidermoide de lábio superior em paciente feoderma, **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac. Camaragibe**, v.11, n.1, p. 27-30, 2011.

SHERR C.J. D-type cyclins. **Trends Biochem Sci**. v.20, n.5, p.187-90, 1995.

SILVA et al., 2011 Performance of p16INK4a Immunocytochemistry as a Marker of Anal Squamous Intraepithelial Lesions. **Cancer Cytopathology**, 2011.

SINGH B. B. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. **Editor: Carl M. Allen**, v. 85, v. 6, 1998.

SINHA, R.P., HÄDER, D.P. UV-induced DNA damage and repair: a review. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.1, p.225–236, 2002.

SHIRATORE, F. H. et al. Estudo sobre a relação entre a radiação ultravioleta e a incidência de câncer de pele. **Revista Ciências do Ambiente On-Line**, v. 5, n.1, 2009.

SOUZA et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: Epidemiological study and clinicopathological associations. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**. v.16 n. 6, p.757-62, 2011.

SPARKNOTES EDITORS. **Sparknote on the cell Cycle**.Sparknotes 2012 Disponível URL: <<http://www.sparknotes.com/biology/cellreproduction/cellcycle/section1.rhtml>>. Acesso em: 29 aug. 2012.

STAIBANO S. et al. Overexpression of cyclin-D1, bcl-2, and bax proteins, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), and DNA-ploidy in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Hum Pathol**. v.29, n.11, p.1189-94, 1998.

TANDA N. et al. Expression of apoptotic signaling proteins in leukoplakia and oral lichen planus: quantitative and topographical studies. **J Oral Pathol Med** , v. 29, n. 8, p. 385-393, 2000.

TEIXEIRA et al., 2009. Carcinoma Espinocelular da Cavidade Bucal: um Estudo Epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.55, n.3, p.229-236, 2009.

THAN T. H. et al. Expression of galectin -3 and galectin -7 in tireoid malignancy as a potencial diagnostic indicators. **Singapore Med. J.**, v49, n.4, p. 333-8, 2008.

UZAWA et al. Fluorescence in situ hibridization for detectinggenomic alterations of cyclin D1 and P16 in oral squamous cell carcinomas. **American Cancer Society**, v.110, n.10,2007.

VIEIRA, M. EM, M. ME e ME, SA. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An Bras Dermatol.** v. 87, n.1, p.105-14, 2012.

VISSCHER. J. G. A. M. Epidemiology of cancer of the lip in the Netherlands. **Oral Oncology.** V. 34, p. 421±426, 1998.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa;terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 317-23, 2009.

VAIRAKTARIS et al.. Loss of Tumour Suppressor p16 Expression in Initial Stages of Oral Oncogenesis. **Anticancer research**, v. 27, p.979-984, 2007.

WARNAKULASURIYA S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 45, p. 309–316, 2009.

WARNAKULASURIYA S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol.** v. 45, n. (4-5):309-16,2009.

XAVIER, F. C. A. et al. P63 Immunoexpression in lip carcinogenesis. **J. Mol. Hist.**, v. 40, p. 131-137, 2009.

YANG W. et al. Expression of VEGF, EGFR, p16 in lip cancers and oral squamous cell carcinomas and their clinic significance. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* v. 37, n.2, p.99-101, 2002.

YASUMATSU et al. Cyclin D1 expression does not affectcell proliferation in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland, *Eur Arch. Otorhinolaryngol*, v. 34, p. 295-297, 2004.

YONAMINE et al. Associação entre a expressão de p16 e neoplasias intra-epiteliais. **Arq. Ciência. Saúde**, v. 16, v. 4, p. 161-165, 2009.

YAO, L.; IWAI, M. FURULA, I. Correlations of Bcl-2 and P53 Expression with the clinicopathological features in tongue squamous cell carcinoma. **Oral Oncolol.** v. 35, n. 1, p.56-62. 1999:

OBRAS CONSULTADAS

ABREU, M. A. M. et. al. Carcinoma Espinocelular do lábio: Avaliação de valores prognósticos. **Ver. Bras. Otorrinolaringo.**, v. 70, n. 6, p. 765-770, 2004.

ALVES, P. M. **Avaliação imuno-histoquímica das galectinas -1, -3, -4 e -7 em carcinomas epidermóides de língua.** Tese de pós-graduação. Natal-Rio Grande do Norte, 2009.

ARAÚJO-FILHO, J. L. S et. al. Galectinas-3 em tumores de próstata: Imuno-histoquímico e análise digital de imagens. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 6, p. 469-475, 2006.

BARROS, R.M.G.; MAGALHÃES, A.V; SCHIMIT, F.C; Câncer de boca: expressão imuno-histoquímica de C-erbB-2, Bcl2 e Egfr- estudo comparativo com leucoplasia e hiperplasia inflamatória. **Revista Odontol. Ciência – Fac. Odontol. PUCRS**, v. 20, n. 50, Out-Dez, 2005.

CAMPISI, G. MARGIOTTA, V. Oral mucosal lesions and risk habits among men in Italian study population, **J. Oral Pathol. Med**, v. 30, p. 22-28, 2001.

JONES, P. A.; BAYLIN, B. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat. Rev. Genet.**, v3, p. 415-428, 2002.

JONHSON, N. Orofacial neoplasms: global epidemiology, risk factors and recommendation for research. **Int. Dent J**, v.41, p.365, 1991.

KUJAN, O. et al. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: An attempt to understand the sources of variations. **Oral Oncology**, v. 43, p. 224-231, 2007.

MATARESSE, P.; TINARI, N.; SEMERAROA, M. L.; NATOLIB, C.; LACOBELLI, S.; MARLORNI, W. Galectin -3 overexpression protects from cell damage ad death by influency mitochondrial homeostasis. **FEBS Let.**, v. 473, p. 311-315, 2000.

NOVELLINO, A.T. N; AMORIN R.F.B.; QUEIROZ, L.M.G.; FREITAS, R.A. Análise da expressão do PCNA e p53 em carcinomas de células escamosas oral. Correlação com a gradação histológica de malignidade e características clínicas. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 18, n.5, 2003.

SOUZA,F.A.C.G;BRANDÃO,A.A.H.;ALMEIDA,J.D., ROSA, L.E.B. **Alterações Gênicas e Câncer Bucal-** Uma breve revisão. 2004.

YANG, R.Y., LIU, F.T. Galectins in cell growth and apoptosis. **Cell Mol. Life**, v. 60, p. 267-276, 2003.

YU, F. et al. Galectins-3 translocate to the perinuclear membrane and inhibits cytochrome c release from the mitochondrial. A role for synexin in galectin-3 translocation. **J. Biol. Chem.**, v.273, 2002

XIE,X.; CLAUSEN, O. P. F.; BOYSEN, M. Prognostic significance of p21 (WAF1/CIP1) expression in tongue squamous cell carcinomas. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**,v.128, 2002.

WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese, **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, n. 04, 2002.

APÊNDICE 1- Tabela histológica para os carcinomas epidermóides de lábio.

| DADOS GERAIS - CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS | | | | | | | | | | | | |
|--|----------|-------------|------|-------|------|------------------------|-----------------|-----------------------|----------|----------------------|----------|------------------|
| N. | N. PROT. | DIAGNÓSTICO | SEXO | IDADE | RAÇA | GRAD. DA PEÇA (FCECON) | GRAD. DA LÂMINA | Áreas Histológicas | | | | |
| | | | | | | | | LENCÓIS/MASSAS/ ILHAS | CORDÕES | PÉROLAS DE QUERATINA | ILHOTAS | CÉLULAS ISOLADAS |
| 1 | 1296-06 | CEL | M | 42 | | BD | BD | 1 | | 1 | | |
| 2 | 1239-09 | CEL | M | 82 | | BD | BD | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 3 | 0353-10 | CEL | M | 64 | | BD | BD | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 4 | 1013/02 | CEL | F | 77 | B | BD | BD | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 5 | 2497/02 | CEL | F | 86 | P | BD | BD | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 6 | 2441/03 | CEL | M | 57 | B | PD | MD | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 7 | 2645/03 | CEL | M | 46 | P | BD | BD | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 8 | 2300/06 | CEL | F | 49 | P | BD | MD | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | 1007/07 | CEL | F | 50 | P | BD | BD | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | 3635/07 | CEL | M | 52 | P | BD | BD | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 11 | 1296/07 | CEL | M | 70 | P | BD | BD | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 12 | 0671/08 | CEL | F | 84 | P | MD | MD | 1 | 1 | | 1 | 1 |
| 13 | 1486/09 | CEL | F | 70 | P | BD | BD | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 14 | 0295/11 | CEL | F | 62 | P | MD | MD | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 15 | 11191/11 | CEL | F | 86 | P | BD | MD | 1 | | | 1 | |
| 16 | 2263/11 | CEL | M | 66 | P | BD | BD | 1 | | 1 | | |
| 17 | 2777/11 | CEL | F | 70 | P | PD | PD | 1 | 1 | | 1 | 1 |
| ÁREA INEXISTENTES | | | | | | | | 17 de 17 | 14 de 17 | 14 de 17 | 15 de 17 | 10 de 17 |
| Excluído para Bcl2 | | | | | | | | | | | | |
| Excluído para p16 e CD1 | | | | | | | | | | | | |

APÊNDICE 2 – Tabela do grupo dos carcinomas para a proteína Bcl-2.

| GRUPO 3 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------|------------|---------------------|---------|---------|--------------------|---------|--------------------------|--------|--------|----------------------|--------------------|--------|--|--------|--------|--------|
| Nº | INST. | N. de Pro. | GRADUAÇÃO DA LÂMINA | | | Bcl-2 | | | | | | | | | | | |
| | | | BD | MD | PD | Status de marcação | | % Percentual de marcação | | | | Áreas Histológicas | | | | | |
| | | | | | | P | N | (+) | (++) | (+++) | (++++) | LM | CO | PQ | IL | CI | |
| 1 | UFAM | 1296-06 | 1 | | | | 2 | | | | | | | | | | |
| 2 | UFAM | 1239-09 | 1 | | | | 1 | | 1 | | | | 2 | 1 | 2 | 1 | |
| 3 | UFAM | 0353-10 | 1 | | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 4 | FCECON | 1013/02 | 1 | | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 5 | FCECON | 2497/02 | 1 | | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 6 | FCECON | 2441/03 | | 2 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 7 | FCECON | 2645/03 | 1 | | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 8 | FCECON | 2300/06 | | 2 | | | 1 | | 1 | | | | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 |
| 9 | FCECON | 1296/07 | 1 | | | | 1 | | 1 | | | | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 |
| 10 | FCECON | 0671/08 | | 2 | | | 1 | | 1 | | | | 2 | 1 | | 2 | 2 |
| 11 | FCECON | 1486/09 | 1 | | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 12 | FCECON | 0295/11 | | 2 | | | 1 | | 2 | | | | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| 13 | FCECON | 11191/11 | | 2 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 14 | FCECON | 2777/11 | | | 3 | | 1 | | 1 | | | | 2 | 1 | | 2 | 2 |
| 14 casos ao todo | | | 8 de 14 | 5 de 14 | 1 de 14 | 6 de 14 | 8 de 14 | 5 de 6 | 1 de 6 | 0 de 6 | 0 de 6 | 0 de 6 | 2 de 6 | 4 de 6 | 0 de 4 | 2 de 6 | 2 de 5 |
| | | | | | | | | | | | Para casos positivos | | | Para casos positivos e com áreas presentes | | | |

Legenda:
Gradação Histológica: Bem diferenciado (BD): 1; Moderadamente diferenciado (MD): 2; Pouco diferenciado (PD): 3
Status da marcação: P = Positivo (Houve Marcação): 1 / N = Negativo (Não Houve Marcação): 2
% = Percentual de Marcação: (+) Até 25%; 1 / (++) entre 26% e 50% de células marcadas: 2 / (+++) Entre 51% e 75% de células marcadas: 3 / (++++) mais de 75%: 4
Áreas Histológicas: LMI: Lençóis-Massas-Ilhas/ C: Cordões/ PQ: Pérolas de Queratina/ I: Ilhotas / CI: Células Isoladas: 1 (Houve Marcação); 2 (Não Houve Marcação)

| |
|-------------------|
| ÁREA INEXISTENTES |
|-------------------|

APÊNDICE 3 – Tabela do grupo dos carcinomas para a proteína p16^{INK4a}.

| GRUPO 3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------|------------|---------------------|---------|---------|--------------------|---------|--------------------------|---------|---------|----------------------|--------------------|---------|--|---------|--------|
| Nº | INST. | N. de Pro. | GRADUAÇÃO DA LÂMINA | | | P16 | | | | | | | | | | |
| | | | BD | MD | PD | Status de marcação | | % Percentual de marcação | | | | Áreas Histológicas | | | | |
| | | | | | | P | N | (+) | (++) | (+++) | (++++) | LMI | CO | PQ | IL | CI |
| 1 | UFAM | 1296-06 | 1 | | | 1 | | | | | 4 | 1 | | 1 | | |
| 2 | UFAM | 1239-09 | 1 | | | 1 | | 1 | | | | 2 | 1 | 2 | 1 | |
| 3 | UFAM | 0353-10 | 1 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 4 | FCECON | 1013/02 | 1 | | | 1 | | 1 | | | | 1 | 2 | 1 | 2 | |
| 5 | FCECON | 2497/02 | 1 | | | 1 | | 1 | | | | 2 | 2 | 1 | 2 | |
| 6 | FCECON | 2441/03 | | 2 | | 1 | | | 2 | | | 1 | 1 | 1 | 2 | |
| 7 | FCECON | 2645/03 | 1 | | | 1 | | 1 | | | | 2 | 1 | 1 | 2 | |
| 8 | FCECON | 2300/06 | | 2 | | 1 | | 1 | | | | 1 | 2 | 2 | 2 | |
| 9 | FCECON | 1007/07 | 1 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 10 | FCECON | 3635/07 | 1 | | | 1 | | 1 | | | | 2 | 2 | 1 | 2 | |
| 11 | FCECON | 1296/07 | 1 | | | 1 | | 1 | | | | 2 | 2 | 1 | 2 | |
| 12 | FCECON | 1486/09 | 1 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 13 | FCECON | 0295/11 | | 2 | | 1 | | 1 | | | | 1 | 2 | 2 | 2 | |
| 14 | FCECON | 11191/11 | | 2 | | | 2 | | | | | | | | | |
| 15 | FCECON | 2263/11 | 1 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 16 | FCECON | 2777/11 | | | 3 | 1 | | | | 3 | | 1 | 1 | | 1 | |
| 16 casos ao todo | | | 11 de 16 | 4 de 16 | 1 de 16 | 11 de 16 | 5 de 16 | 8 de 10 | 1 de 10 | 1 de 10 | 1 de 10 | 6 de 11 | 4 de 10 | 7 de 10 | 2 de 10 | 2 de 8 |
| | | | | | | | | | | | Para casos positivos | | | Para casos positivos e com áreas presentes | | |

Legenda:

Gradação Histológica: Bem diferenciado (BD): 1; Moderadamente diferenciado (MD): 2; Pouco diferenciado (PD): 3

Status da marcação: P = Positivo (Houve Marcação): 1 / N = Negativo (Não Houve Marcação): 2

% = Percentual de Marcação: (+) Até 25%: 1 / (++) entre 26% e 50% de células marcadas: 2 / (+++) Entre 51% e 75% de células marcadas: 3 / (++++) mais de 75%: 4

Áreas Histológicas: LMI: Lençóis-Massas-Ilhas/ C: Cordões/ PQ: Pérolas de Queratina/ I: Ilhotas/ CI: Células Isoladas: 1 (Houve Marcação); 2 (Não Houve Marcação)

ÁREA INEXISTENTES

APÊNDICE 4 – Tabela do grupo dos carcinomas para a proteína ciclina D1.

| GRUPO 3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------|------------|---------------------|---------|---------|--------------------|----------|--------------------------|--------|--------|----------------------|--------------------|--------|--|--------|--------|
| Nº | INST. | N. de Pro. | GRADUAÇÃO DA LÂMINA | | | CD1 | | | | | | | | | | |
| | | | BD | MD | PD | Status de marcação | | % Percentual de marcação | | | | Áreas Histológicas | | | | |
| | | | | | | P | N | (+) | (++) | (+++) | (++++) | LMI | CO | PQ | IL | CI |
| 1 | UFAM | 1296-06 | 1 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 2 | UFAM | 1239-09 | 1 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 3 | UFAM | 0353-10 | 1 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 4 | FCECON | 1013/02 | 1 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 5 | FCECON | 2497/02 | 1 | | | 1 | | | 2 | | | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| 6 | FCECON | 2441/03 | | 2 | | | 2 | | | | | | | | 2 | |
| 7 | FCECON | 2645/03 | 1 | | | 1 | | | | 3 | | 1 | 1 | 1 | 2 | |
| 8 | FCECON | 2300/06 | | 2 | | | 2 | | | | | | | | | |
| 9 | FCECON | 1007/07 | 1 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 10 | FCECON | 3635/07 | 1 | | | | 2 | | | | | | | | | |
| 11 | FCECON | 1296/07 | 1 | | | 1 | | 1 | | | | 2 | 1 | 2 | 2 | |
| 12 | FCECON | 1486/09 | 1 | | | 1 | | 1 | | | | 2 | 1 | 2 | 2 | |
| 13 | FCECON | 0295/11 | | 2 | | 1 | | 1 | | | | 1 | 1 | 2 | 2 | |
| 14 | FCECON | 11191/11 | | 2 | | | 2 | | | | | | | | | |
| 15 | FCECON | 2263/11 | 1 | | | 1 | | 1 | | | | 2 | | 1 | | |
| 16 | FCECON | 2777/11 | | | 3 | | 2 | | | | | | | | | |
| 16 casos ao todo | | | 11 de 16 | 4 de 16 | 1 de 16 | 6 de 16 | 10 de 16 | 4 de 6 | 1 de 6 | 1 de 6 | 0 de 6 | 3 de 6 | 5 de 5 | 3 de 6 | 1 de 5 | 0 de 4 |
| | | | | | | | | | | | Para casos positivos | | | Para casos positivos e com áreas presentes | | |

Legenda:

Gradação da Histológica: Bem diferenciado (BD): 1; Moderadamente diferenciado (MD): 2; Pouco diferenciado (PD): 3

Status da marcação: P = Positivo (Houve Marcação): 1 / N = Negativo (Não Houve Marcação): 2

% = Percentual de Marcação: (+) Até 25%: 1 / (++) entre 26% e 50% de células marcadas: 2 / (+++) Entre 51% e 75% de células marcadas: 3 / (++++) mais de 75%: 4

Áreas Histológicas: LMI: Lençóis-Massas-Ilhas/ C: Cordões/ PQ: Pérolas de Queratina/ I: Ilhotas/ CI: Células Isoladas: 1 (Houve Marcação); 2 (Não Houve Marcação)

ÁREA INEXISTENTES

APÊNDICE -5 Tabela do grupo das queilites actínicas para as proteínas Bcl-2, p16^{INK4a} e ciclina D1.

| GRUPO 2 - QA | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|-------|---------|------|-------|----------|-----------|--------------------|-----|-----|-------------|----|---|---|-----|----|---|---|-----|----|---|---|------------------------|-----|-----|---|---|--|
| Nº | INST. | N. Pro. | SEXO | IDADE | Gr. OMS | GR. Kujan | Status de marcação | | | Localização | | | | | | | | | | | | Percentual de marcação | | | | | |
| | | | | | | | | | | Bcl-2 | | | | p16 | | | | CD1 | | | | | | | | | |
| | | | | | | | Bcl-2 | p16 | CD1 | B | SB | S | T | B | SB | S | T | B | SB | S | T | Bcl-2 | p16 | CD1 | | | |
| 1 | UFAM | 0340-07 | F | 61 | DISCRETO | BR | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | |
| 2 | UFAM | 934-08 | M | 50 | MODERADO | BR | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | | 2 | 3 | | |
| 3 | UFAM | 0651-09 | F | 49 | DISCRETO | BR | 1 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | | |
| 4 | UFAM | 1955-11 | M | 59 | DISCRETO | BR | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 4 | 3 | 1 | | | |

Legenda:

Status da marcação: P = Positivo (Houve Marcação); 1 / N = Negativo (Não Houve Marcação): 2

Localização: 1 (Houve Marcação); 2 (Não Houve Marcação)

% = Percentual de Marcação: (+) Até 25%; 1 / (++) entre 26% e 50% de células marcadas: 2 / (+++) Entre 51% e 75% de células marcadas: 3 / (++++) mais de 75%: 4

Localização: B: Basal / SB: Supra-Basal / S: Superficial / T: Todas: 1 (Houve Marcação); 2 (Não Houve Marcação)

APÊNDICE 6 - Tabela do grupo das lesões reativas do lábio para as proteínas Bcl-2, p16^{INK4a} e ciclina D1.

| GRUPO 1 - LR | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|------------|-------------|--------------------|-----|-----|-------------|----|---|---|-----|----|---|---|-----|----|---|---|------------------------|-----|-----|
| Nº | N. de Pro. | DIAGNÓSTICO | Status de marcação | | | Localização | | | | | | | | | | | | Percentual de marcação | | |
| | | | | | | Bcl-2 | | | | p16 | | | | CD1 | | | | | | |
| | | | Bcl-2 | p16 | CD1 | B | SB | S | T | B | SB | S | T | B | SB | S | T | Bcl-2 | p16 | CD1 |
| 1 | 557/07 | FIBROMA | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 1 | 3 |
| 2 | 2427/11 | FIBROMA | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | |
| 3 | 979/10 | MUCOCELE | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | | 3 |
| 4 | 1005/07 | FIBROMA | | | 2 | | | | | | | | | 2 | 2 | 2 | 2 | | | |
| 5 | 535/10 | FRIBROLIPO | 1 | | | 1 | 2 | 2 | 2 | | | | | | | | | 3 | | |
| 6 | 1200/02 | FIBROMA | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 2 | 3 | 4 | 3 |

Legenda:

Status da marcação: P = Positivo (Houve Marcação); 1 / N = Negativo (Não Houve Marcação): 2

Localização: 1 (Houve Marcação); 2 (Não Houve Marcação)

% = Percentual de Marcação: (+) Até 25%; 1 / (++) entre 26% e 50% de células marcadas: 2 / (+++) Entre 51% e 75% de células marcadas: 3 / (++++) mais de 75%: 4

APÊNDICE 7- Análises estatísticas.

| Status de marcação | GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA (p16) | | | | | | Total |
|--------------------|-----------------------------|------|----|------|----|------|-------|
| | BD | % | MD | % | PD | % | |
| Bcl-2 | | | | | | | |
| Positivo | 2 | 33,3 | 3 | 50,0 | 1 | 16,7 | 6 |
| Negativo | 6 | 75,0 | 2 | 25,0 | 0 | 0,0 | 8 |
| pvalor =0,277 | | | | | | | |
| p16 | | | | | | | |
| Positivo | 7 | 63,6 | 3 | 27,3 | 1 | 9,1 | 11 |
| Negativo | 4 | 80,0 | 1 | 20,0 | 0 | 0,0 | 5 |
| pvalor >0,99 | | | | | | | |
| CD1 | | | | | | | |
| Positivo | 5 | 83,3 | 1 | 16,7 | 0 | 0,0 | 6 |
| Negativo | 6 | 60,0 | 3 | 30,0 | 1 | 10,0 | 10 |
| pvalor = 0,753 | | | | | | | |

| Percentual de marcação | GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA (CD1) | | | | | | Total |
|------------------------|-----------------------------|-------|----|-------|----|-------|-------|
| | BD | % | MD | % | PD | % | |
| Bcl-2 | | | | | | | |
| + | 2 | 40,0 | 2 | 40,0 | 1 | 20,0 | 5 |
| ++ | 0 | 0,0 | 1 | 100,0 | 0 | 0,0 | 1 |
| pvalor >0,99 | | | | | | | |
| p16 | | | | | | | |
| + | 6 | 75,0 | 2 | 25,0 | 1 | 12,5 | 8 |
| ++ | 0 | 0,0 | 1 | 100,0 | 0 | 0,0 | 1 |
| +++ | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 100,0 | 1 |
| ++++ | 1 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 |
| pvalor = 0,364 | | | | | | | |
| CD1 | | | | | | | |
| + | 3 | 75,0 | 1 | 25,0 | 0 | 0,0 | 4 |
| ++ | 1 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 |
| +++ | 1 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 |
| pvalor >0,99 | | | | | | | |

| Áreas Histológicas | Status de marcação (Bcl-2) | | | | Total | p-valor |
|-----------------------|----------------------------|-------|----------|-----|-------|---------|
| | Positivo | % | Negativo | % | | |
| LMI | | | | | | |
| Houve Marcação | 2 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2 | - |
| Não Houve Marcação | 4 | 100,0 | 0 | 0,0 | 4 | |
| CO | | | | | | |
| Houve Marcação | 4 | 100,0 | 0 | 0,0 | 4 | - |
| Não Houve Marcação | 2 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2 | |
| PQ | | | | | | |
| Houve Marcação | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | - |
| Não Houve Marcação | 4 | 100,0 | 0 | 0,0 | 4 | |
| IL | | | | | | |
| Houve Marcação | 2 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2 | - |
| Não Houve Marcação | 4 | 100,0 | 0 | 0,0 | 4 | |
| CI | | | | | | |
| Houve Marcação | 2 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2 | - |
| Não Houve Marcação | 3 | 100,0 | 0 | 0,0 | 3 | |
| Teste Exato de Fisher | | | | | | |

| Áreas Histológicas | Status de marcação (P16) | | | | Total | p-valor |
|-----------------------|--------------------------|-------|----------|-----|-------|---------|
| | Positivo | % | Negativo | % | | |
| LMI | | | | | | |
| Houve Marcação | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 | 6 | - |
| Não Houve Marcação | 5 | 100,0 | 0 | 0,0 | 5 | |
| CO | | | | | | |
| Houve Marcação | 4 | 100,0 | 0 | 0,0 | 4 | - |
| Não Houve Marcação | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 | 6 | |
| PQ | | | | | | |
| Houve Marcação | 7 | 100,0 | 0 | 0,0 | 7 | - |
| Não Houve Marcação | 3 | 100,0 | 0 | 0,0 | 3 | |
| IL | | | | | | |
| Houve Marcação | 2 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2 | - |
| Não Houve Marcação | 8 | 100,0 | 0 | 0,0 | 8 | |
| CI | | | | | | |
| Houve Marcação | 2 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2 | - |
| Não Houve Marcação | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 | 6 | |
| Teste Exato de Fisher | | | | | | |

| Áreas Histológicas | Status de marcação (CD1) | | | | Total | p-valor |
|-----------------------|--------------------------|-------|----------|-----|-------|---------|
| | Positivo | % | Negativo | % | | |
| LMI | | | | | | |
| Houve Marcação | 3 | 100,0 | 0 | 0,0 | 3 | - |
| Não Houve Marcação | 3 | 100,0 | 0 | 0,0 | 3 | |
| CO | | | | | | |
| Houve Marcação | 5 | 100,0 | 0 | 0,0 | 5 | - |
| Não Houve Marcação | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | |
| PQ | | | | | | |
| Houve Marcação | 3 | 100,0 | 0 | 0,0 | 3 | - |
| Não Houve Marcação | 3 | 100,0 | 0 | 0,0 | 3 | |
| IL | | | | | | |
| Houve Marcação | 1 | 100,0 | 0 | 0,0 | 1 | - |
| Não Houve Marcação | 4 | 100,0 | 0 | 0,0 | 4 | |
| CI | | | | | | |
| Houve Marcação | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | - |
| Não Houve Marcação | 4 | 100,0 | 0 | 0,0 | 4 | |
| Teste Exato de Fisher | | | | | | |

| Áreas Histológicas | Percentual de marcação (Bcl-2) | | | | Total | p-valor |
|-----------------------|--------------------------------|-------|----|------|-------|---------|
| | + | % | ++ | % | | |
| LMI | | | | | | |
| Houve Marcação | 1 | 50,0 | 1 | 50,0 | 2 | 0,33 |
| Não Houve Marcação | 4 | 100,0 | 0 | 0,0 | 4 | |
| CO | | | | | | |
| Houve Marcação | 3 | 75,0 | 1 | 25,0 | 4 | >0,99 |
| Não Houve Marcação | 2 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2 | |
| PQ | | | | | | |
| Houve Marcação | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | >0,99 |
| Não Houve Marcação | 3 | 75,0 | 1 | 25,0 | 4 | |
| IL | | | | | | |
| Houve Marcação | 2 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2 | >0,99 |
| Não Houve Marcação | 3 | 75,0 | 1 | 25,0 | 4 | |
| CI | | | | | | |
| Houve Marcação | 2 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2 | >0,99 |
| Não Houve Marcação | 2 | 66,7 | 1 | 33,3 | 3 | |
| Teste Exato de Fisher | | | | | | |

| Áreas Histológicas | Percentual de marcação (P16) | | | | | | | | Total | p-valor |
|--------------------|------------------------------|-------|----|------|-----|------|------|------|-------|---------|
| | + | % | ++ | % | +++ | % | ++++ | % | | |
| LMI | | | | | | | | | | |
| Houve Marcação | 3 | 50,0 | 1 | 16,7 | 1 | 16,7 | 1 | 16,7 | 6 | 0,546 |
| Não Houve Marcação | 5 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 5 | |
| CO | | | | | | | | | | |
| Houve Marcação | 2 | 50,0 | 1 | 25,0 | 1 | 25,0 | 0 | 0,0 | 4 | 0,133 |
| Não Houve Marcação | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 6 | |
| PQ | | | | | | | | | | |
| Houve Marcação | 5 | 0,0 | 1 | 0,0 | 0 | 0,0 | 1 | 14,3 | 7 | >0,99 |
| Não Houve Marcação | 3 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 3 | |
| IL | | | | | | | | | | |
| Houve Marcação | 1 | 50,0 | 0 | 0,0 | 1 | 50,0 | 0 | 0,0 | 2 | 0,378 |
| Não Houve Marcação | 7 | 87,5 | 1 | 12,5 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 8 | |
| CI | | | | | | | | | | |
| Houve Marcação | 0 | 0,0 | 1 | 50,0 | 1 | 50,0 | 0 | 0,0 | 2 | 0,036 |
| Não Houve Marcação | 6 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 6 | |

| Áreas Histológicas | Percentual de marcação (CD1) | | | | | | Total | p-valor |
|-----------------------|------------------------------|-------|----|-------|-----|------|-------|---------|
| | + | % | ++ | % | +++ | % | | |
| LMI | | | | | | | | |
| Houve Marcação | 1 | 33,3 | 1 | 33,3 | 1 | 33,3 | 3 | 0,4 |
| Não Houve Marcação | 3 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 3 | |
| CO | | | | | | | | |
| Houve Marcação | 3 | 60,0 | 1 | 20,0 | 1 | 20,0 | 5 | >0,99 |
| Não Houve Marcação | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | |
| PQ | | | | | | | | |
| Houve Marcação | 1 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 33,3 | 3 | 0,4 |
| Não Houve Marcação | 3 | 100,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 3 | |
| IL | | | | | | | | |
| Houve Marcação | 0 | 0,0 | 1 | 100,0 | 0 | 0,0 | 1 | 0,1 |
| Não Houve Marcação | 3 | 75,0 | 0 | 0,0 | 1 | 25,0 | 4 | |
| CI | | | | | | | | |
| Houve Marcação | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | >0,99 |
| Não Houve Marcação | 2 | 50,0 | 1 | 25,0 | 1 | 25,0 | 4 | |
| Teste Exato de Fisher | | | | | | | | |

| | Status de marcação | | | | p-valor |
|-----------------------|--------------------|-----|------------|-----|---------|
| | G2 | | G3 | | |
| | Positivo/n | % | Positivo/n | % | |
| BCL-2 | | | | | |
| Positivo | 3 | 75% | 6 | 43% | 0,577 |
| Total | 4 | | 14 | | |
| P16 | | | | | |
| Positivo | 3 | 75% | 11 | 69% | >0,99 |
| Total | 4 | | 16 | | |
| CD1 | | | | | |
| Positivo | 3 | 75% | 6 | 38% | 0,285 |
| Total | 4 | | 16 | | |
| Teste Exato de Fisher | | | | | |

| | Status de marcação | | | | p-valor |
|-----------------------|--------------------|-----|-----------|-----|---------|
| | G2 | | G3 | | |
| | n | % | n | % | |
| Bcl -2 | | | | | |
| + | 1 | 33% | 5 | 83% | 0,226 |
| ++ | 0 | 0% | 1 | 17% | |
| +++ | 1 | 33% | 0 | 0% | |
| ++++ | 1 | 33% | 0 | 0% | |
| Total | 3 | | 6 | | |
| P16 | | | | | |
| + | 0 | 0% | 8 | 73% | 0,055 |
| ++ | 2 | 67% | 1 | 9% | |
| +++ | 1 | 33% | 1 | 9% | |
| ++++ | 0 | 0% | 1 | 9% | |
| Total | 3 | | 11 | | |
| CD1 | | | | | |
| + | 2 | 67% | 4 | 67% | >0,99 |
| ++ | 0 | 0% | 1 | 17% | |
| +++ | 1 | 33% | 1 | 17% | |
| Total | 3 | | 6 | | |
| Teste Exato de Fisher | | | | | |

| | Status de marcação | | | | p-valor |
|--------------|--------------------|------|------------|-----|---------|
| | G1 | | G2 | | |
| | Positivo/n | % | Positivo/n | % | |
| BCL-2 | | | | | |
| Positivo | 5 | 100% | 3 | 75% | 0,444 |
| Total | 5 | | 4 | | |
| P16 | | | | | |
| Positivo | 3 | 75% | 3 | 75% | >0,99 |
| Total | 4 | | 4 | | |
| CD1 | | | | | |
| Positivo | 3 | 60% | 3 | 75% | >0,99 |
| Total | 5 | | 4 | | |

| Percentual de marcação | Grupo | | | | Total |
|------------------------|-------|-------|---|-------|-------|
| | 1 | % | 2 | % | |
| Bcl -2 | | | | | |
| + | 0 | 0,0 | 1 | 100,0 | 1 |
| ++ | 2 | 100,0 | 0 | 0,0 | 2 |
| +++ | 2 | 66,7 | 1 | 33,3 | 3 |
| ++++ | 0 | 0,0 | 1 | 100,0 | 1 |
| pvalor = 0,486 | | | | | |
| p16 | | | | | |
| + | 1 | 100,0 | 0 | 0,0 | 1 |
| ++ | 0 | 0,0 | 2 | 100,0 | 2 |
| +++ | 1 | 50,0 | 1 | 50,0 | 2 |
| pvalor = 0,6 | | | | | |
| CD1 | | | | | |
| + | 0 | 0,0 | 2 | 100,0 | 2 |
| +++ | 2 | 66,7 | 1 | 33,3 | 3 |
| pvalor >0,99 | | | | | |

| | Status de marcação | | | | p-valor |
|-----------------------|--------------------|------|------------|-----|---------|
| | G1 | | G3 | | |
| | Positivo/n | % | Positivo/n | % | |
| BCL-2 | | | | | |
| Positivo | 5 | 100% | 6 | 43% | 0,046 |
| Total | 5 | | 14 | | |
| P16 | | | | | |
| Positivo | 3 | 75% | 11 | 69% | >0,99 |
| Total | 4 | | 16 | | |
| CD1 | | | | | |
| Positivo | 3 | 60% | 6 | 38% | 1 |
| Total | 5 | | 16 | | |
| Teste Exato de Fisher | | | | | |

| Áreas Histológicas | PQ da Área Histológica | | | | Total |
|-----------------------|------------------------|-------|--------------------|-------|-------|
| | Houve Marcação | % | Não Houve Marcação | % | |
| PQ p16 | | | | | |
| Houve Marcação | 1 | 14,3 | 6 | 85,7 | 7 |
| Não Houve Marcação | 3 | 100,0 | 0 | 0,0 | 3 |
| pvalor =0,033 | | | | | |
| PQ CD1 | | | | | |
| Houve Marcação | 0 | 0,0 | 3 | 100,0 | 3 |
| Não Houve Marcação | 2 | 66,7 | 1 | 33,3 | 3 |
| pvalor =0,4 | | | | | |
| Teste Exato de Fisher | | | | | |

| | Status de marcação | | | | p-valor |
|-----------------------|--------------------|------|-----------|-----|---------|
| | G1 | | G3 | | |
| | n | % | n | % | |
| Bcl -2 | | | | | |
| + | 0 | 0% | 5 | 83% | 0,015 |
| ++ | 2 | 40% | 1 | 17% | |
| +++ | 3 | 60% | 0 | 0% | |
| Total | 5 | | 6 | | |
| P16 | | | | | |
| + | 1 | 33% | 8 | 73% | 0,374 |
| ++ | 0 | 0% | 1 | 9% | |
| +++ | 1 | 33% | 1 | 9% | |
| ++++ | 1 | 33% | 1 | 9% | |
| Total | 3 | | 11 | | |
| CD1 | | | | | |
| + | 0 | 0% | 4 | 67% | 0,095 |
| ++ | 0 | 0% | 1 | 17% | |
| +++ | 3 | 100% | 1 | 17% | |
| Total | 3 | | 6 | | |
| Teste Exato de Fisher | | | | | |