

“AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p16^{INK4a} E FHIT NO PAPILOMA E CARCINOMA ESCAMOCELULAR DA CAVIDADE ORAL”

Maria Clara Diniz de Oliveira
José Uchoa de carvalho
Antônio Alexandre Barbosa Santos
Magda Helena Rocha Dantas

RESUMO:

O câncer oral é um dos dez tumores malignos mais freqüentes, correspondendo a 6,5% dos casos de câncer no mundo. Noventa e cinco por cento dos casos de câncer oral é representado pelo carcinoma de células escamosas (CCEO), que vem apresentando nas últimas décadas aumento significativo em sua incidência. Na grande maioria dos cânceres humanos observa-se que a perda do controle do ciclo celular é essencial para que haja transformação maligna, ocorrendo mutações, deleções e/ou alterações na expressão em pelo menos um dos quatro reguladores chaves do ciclo celular: p16^{INK4a}, ciclina D, CDK4 e Rb. A proteína p16^{INK4a} exerce sua ação no ciclo celular como proteína inibitória ao se ligar às proteínas das famílias CDK4 e CDK6 (quinases dependentes de ciclina), impedindo a associação destas com a ciclina D1. As chances de desenvolver câncer aumentam com a exposição a agentes químicos, físicos e biológicos que provocam mutações e alterações epigenéticas no DNA. Os fatores biológicos incluem alguns fungos e vírus. Entre estes vírus, o papiloma vírus humano (HPV) tem sido detectado com frequência crescente no epitélio oral, displásico e carcinomatoso, em comparação com a mucosa oral normal. Alterações na expressão da proteína

do ciclo celular p16^{INK4a} está descrita em muitos cânceres, incluindo os de cabeça e pescoço. Nos últimos anos, o gene FHIT tem sido muito estudado como um importante gene supressor tumoral, envolvido com o crescimento, proliferação celular e apoptose. Este gene foi identificado na região frágil comum indutível FRA3B no cromossomo 3p14.2 e parece ser inativado por deleções nas linhagens celulares derivadas do câncer, sendo associado à progressão tumoral e ao pior prognóstico da doença. O papiloma da cavidade oral é uma neoplasia epitelial benigna. Sua etiologia está associada ao HPV não oncogênico, particularmente tipos 6 e 11, embora subtipos oncogênicos, tal como o HPV-16, também possam estar a ela relacionados. O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão das proteínas p16^{INK4a} e FHIT em lesões neoplásicas malignas e benignas da cavidade oral. Para tanto, se analisou através da técnica de imunohistoquímica, biópsias de mucosa oral normal, papiloma e CCEO, visando contribuir para melhor compreensão do papel destas proteínas nestas lesões, para que possam vir a ser utilizadas como marcadores moleculares que auxiliem no diagnóstico desses tipos de tumores.

Palavras chaves: câncer de boca, papiloma vírus humano, P16, FHIT

I. INTRODUÇÃO

O câncer oral é um dos dez tumores malignos mais freqüentes, correspondendo a 6,5% dos casos de câncer no mundo (HAFKAMP et al., 2003; PARADISO et al., 2004). Noventa e cinco por cento dos casos de câncer oral é representado pelo carcinoma de células escamosas (CCEO), que vem apresentando nas últimas décadas aumento significativo em sua incidência, chegando a ser considerada uma das mais altas do mundo (DEDIVITIS, 2004; CARVALHO, 2003; NEVILLE et al., 2004). No Brasil, o câncer de boca representa cerca de 3% dos casos de neoplasias malignas, sendo o quinto e o sétimo tipo de câncer mais comum, em homens e mulheres respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Estudos epidemiológicos relatam que a incidência do câncer de boca varia de acordo com a idade, sexo, ocupação, raça e localização anatômica. As faixas etárias mais atingidas pela doença são aquelas acima dos 50 anos, sendo o sexo masculino o mais atingido. A proporção de casos entre homens e mulheres é de 3:1, no entanto, a literatura relata que essa proporção entre os sexos deverá diminuir consideravelmente com o passar do tempo, devido ao fato das mulheres terem modificado seus hábitos e costumes, principalmente com relação ao uso do fumo e álcool, principais fatores de risco para o desenvolvimento desta forma de câncer. Em relação à exposição ocupacional, atividades que envolvem oportunidades de consumo de álcool, como garçons e empregados de cervejarias, têm sido associados a um maior risco de desenvolver esta neoplasia (BLOT et al., 1996). Exposições à radiação solar em atividades ocupacionais de pesca e agricultura, principalmente em pessoas

de pele clara, têm sido relacionadas particularmente ao câncer de lábio (JITOMIRSKI, 2000). No que concerne à raça os indivíduos brancos são os mais afetados, representando cerca de noventa e dois por cento dos casos de câncer de boca. Quanto à localização anatômica o lábio inferior, a borda lateral da língua e assoalho bucal são os sítios mais freqüentemente acometidos (TAVARES & NOMA, 1997; TOMMASI, 2002; ELIAS et al, 2002; NEVILLE, 2004).

Para que ocorra neoplasia maligna é necessário que aconteça uma série de eventos acumulados durante anos, resultantes do desequilíbrio entre a proliferação celular (ciclo celular) e morte celular programada (apoptose). Estes eventos são regulados por múltiplos genes, que, quando sofrem mutações podem ter seus produtos expressos de forma alterada, iniciando a formação do tumor. Na grande maioria dos cânceres humanos observa-se que a perda do controle do ciclo celular é essencial para que haja transformação maligna, ocorrendo mutações, deleções e/ou alterações na expressão em pelo menos um dos quatro reguladores chaves do ciclo celular: p16^{INK4a}, ciclina D, CDK4 e Rb. A proteína p16^{INK4a} exerce sua ação no ciclo celular como proteína inibitória ao se ligar às proteínas das famílias CDK4 e CDK6 (quinases dependentes de ciclina), impedindo a associação destas com a ciclina D1. A inibição do complexo ciclina D1/CDK4/6 impede a fosforilação da pRb, interrompendo desta forma o ciclo celular (HUNTER, 1997; CONTRAN et al, 2005).

As chances de desenvolver câncer aumentam com a exposição a agentes químicos, físicos e biológicos que provocam mutações e alterações epigenéticas no DNA. Entre os agentes químicos envolvidos no carcinoma oral, o uso do tabaco em todas as suas formas é o fator de risco principal para o

desenvolvimento desta neoplasia, particularmente quando associado ao álcool. Entre os agentes físicos, estão a exposição aos raios ultra-violetas e raios X. Os fatores biológicos incluem alguns fungos e vírus. Entre estes vírus, o papiloma vírus humano (HPV) tem sido detectado com frequência crescente no epitélio oral, displásico e carcinomatoso, em comparação com a mucosa oral normal (FRANCESCHI, 2000; MILLER, 2001; KANSKY, 2003; VIDAL, 2004).

Alterações na expressão da proteína do ciclo celular p16^{INK4a} está descrita em muitos cânceres, incluindo melanoma, gliomas, retinoblastoma, osteossarcoma, câncer da mama, pulmão, próstata e carcinoma do colo uterino (KLAES, 2002). A superexpressão da p16^{INK4a}, em lesões malignas da cérvix uterina estão associados com HPV de alto risco, que através da inativação da pRb promovem a superexpressão da p16^{INK4a} (QUEIROZ et al, 2006).

Nos últimos anos, o gene FHIT tem sido muito estudado como um importante gene supressor tumoral, envolvido com o crescimento, proliferação celular e apoptose. Este gene foi identificado na região frágil comum indutível FRA3B no cromossomo 3p14.2 e parece ser inativado por deleções nas linhagens celulares derivadas do câncer, sendo associado à progressão tumoral e ao pior prognóstico da doença. O gene FHIT codifica uma pequena proteína citoplasmática que tem uma atividade de adenosina trifosfato hidrolase. Diversos trabalhos na literatura têm demonstrado que a proteína FHIT, está ausente ou reduzida nos carcinomas cervicais, de pulmão, mama, estômago, esôfago e rim, o que é compatível com sua função supressora de tumores (OHTA et al, 1996; HAYASHI et al, 1997; SOZZI et al, 1997; KIM et al, 2004; D'AGOSTINI et al, 2006).

Alterações na expressão deste gene também têm sido estudadas em linhagens celulares derivadas de cânceres da cabeça e pescoço, incluindo o carcinoma escamocelular da cavidade oral (MAO et al, 1996; VIRGÍLIO et al, 1996). Entre as diversas alterações genéticas encontradas nas lesões de carcinomas escamocelulares orais, observa-se a perda de heterozigose do cromossomo 3, onde se localiza o gene FHIT (MAESTRO et al, 1993; AH-SEE et al, 1994), e ausência ou baixa expressão dessa proteína nestas lesões (KISIELEWSKI et al, 1998; VAN HEERDEN et al, 1999; GUERIN et al, 2006). Estudos recentes têm sugerido que a diminuição na expressão da FHIT correlaciona-se com o uso excessivo de cigarros e/ou álcool em tumores de esôfago (MORI et al, 2000) e de pulmão (SOZZI et al, 1997; KIM et al, 2004; D'AGOSTINI et al, 2006).

O papiloma da cavidade oral é uma neoplasia epitelial benigna. Sua etiologia está associada ao HPV não oncogênico, particularmente tipos 6 e 11, embora subtipos oncogênicos, tal como o HPV-16, também possam estar a ela relacionados (BORAKS, 1996; CONTRAN et al, 2005). São tumores benignos, que ocorrem principalmente entre os 30 e 50 anos. Usualmente, afeta o palato mole, a língua, o freio da língua e o lábio inferior, exibindo uma doença proliferativa, parece não ter relação com o câncer (PIGNATARI et al, 1995). Clinicamente manifesta-se como uma lesão nodular globosa, única ou múltipla, filiforme, pediculada, de coloração avermelhada ou esbranquiçada, superfície opaca e textura áspera, com pequena dimensão (BORAKS, 1996).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão das proteínas p16^{INK4a} e FHIT em lesões neoplásicas malignas e benignas da cavidade oral. Para tanto, se analisou através da técnica de imunohistoquímica, biópsias de

mucosa oral normal, papiloma e CCEO, visando contribuir para melhor compreensão do papel destas proteínas nestas lesões, para que possam vir a ser utilizadas como marcadores moleculares que auxiliem no diagnóstico desses tipos de tumores.

II. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O ciclo celular

O ciclo celular compreende uma seqüência de processos nucleares e citoplasmáticos perfeitamente coordenados, sendo a maneira fundamental pela qual todos os seres vivos são reproduzidos. As células eucarióticas realizam o seu ciclo de divisão duplicando seu conteúdo e dividindo-se em duas células idênticas. Durante esse processo o material genético precisa ser fielmente replicado e segregado em duas células. O ciclo celular é composto de 4 estágios: G1, S, G2 e M. Para que cada fase aconteça de forma organizada, os eventos são controlados separadamente e regulados por diversos “pontos de checagem”, não avançando no ciclo se a fase anterior não estiver completa. Na fase G1 (*gap 1*) há um aumento de tamanho celular e a célula se prepara para a replicação do material genético. Após essa fase, há uma primeira parada do ciclo (*checkpoint R*), quando é verificada a integridade genômica. Durante este evento qualquer anormalidade da informação genética que seja detectada, interrompe a progressão do ciclo até que o reparo seja realizado. A replicação, propriamente dita, ocorre na fase S (síntese) e permite que a célula duplique precisamente seus cromossomos. Após a replicação cromossômica inicia-se a fase G2 (*gap2*), durante a qual a célula se prepara para a fase M (mitose),

quando a célula-mãe, aumentada, finalmente divide-se, para produzir duas células-filhas, com igual número de cromossomos (KASTAN, 1997; ALBERTS et al, 2002) (Figura 1).



Figura 1: Fases do ciclo celular (DIAS, 2005).

Para que o processo de divisão ocorra, alguns eventos seqüenciados necessitam ocorrer. O primeiro passo é a ligação de um fator de crescimento a um receptor específico na membrana plasmática que, através de seus domínios internos, ativa proteínas transdutoras de sinais presentes no citoplasma. A transmissão de sinais pelas proteínas transdutoras até o núcleo ativam proteínas regulatórias nucleares, dando início à progressão do ciclo celular. São conhecidas aproximadamente 50 proteínas que atuam como fatores de crescimento, liberadas por vários tipos celulares, de acordo com as

necessidades do organismo. As células que possuem o receptor específico para um determinado fator de crescimento serão iniciadas no ciclo, enquanto as que não expressam este receptor em sua superfície permanecerão inativas (ALBERTS et al, 2002; CONTRAN et al, 2005; ZAHA et al, 2005).

2.2 Carcinoma Escamocelular Oral

Entre as neoplasias malignas que afetam a cavidade bucal, o carcinoma escamocelular é responsável por noventa e cinco por cento do total de casos. Os outros cinco por cento são representados por melanomas, sarcomas e neoplasias das glândulas salivares (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

O carcinoma escamocelular oral, também denominado carcinoma epidermóide ou carcinoma espinocelular, é uma neoplasia maligna epitelial que tem a sua origem em células próximas a camada basal que, devido a agentes etiológicos diversos, passaram a ter uma capacidade de expansão anormal e acabam por substituir o epitélio normal (NAPGAL & DAS, 2003).

Clinicamente, o Carcinoma escamocelular apresenta nas fases iniciais aspecto variado assemelhando-se a leucoplasia, eritroplasia ou eritroleucoplasia (SOUSA et al, 2004). Com a evolução da doença, o carcinoma escamocelular pode tornar-se uma lesão endofítica ou exofítica, dependendo do seu padrão de crescimento, ambas possuindo um caráter infiltrativo, que resulta em uma lesão mal delimitada, endurecida e de superfície granulosa (Figura 3) (TOMMASI, 2002). Os sítios mais afetados são lábio, língua e assoalho da boca, podendo também afetar trígono retro-molar, mucosa jugal, rebordo alveolar e palato duro. Essa patologia pode levar à destruição do osso

subjacente levando a uma radiotransparência com margens indefinidas. Apesar dessas lesões se localizarem em áreas de fácil acesso ao exame, a maioria delas possui diagnóstico tardio devido à ausência de dor (NEVILLE et al, 2004).



Figura 3: Aspecto clínico do Carcinoma escamocelular em língua. (BORAKS, 1996).

Histopatologicamente, o carcinoma escamocelular é caracterizado por ilhas e cordões invasivos de células epiteliais malignas que assemelham-se às células da camada espinhosa. As células neoplásicas apresentam, em geral, citoplasma abundante com núcleos grandes e um aumento da relação núcleo/citoplasma. Graus variados de pleomorfismo celular e nuclear são também frequentemente observados (Figura 4) (NEVILLE et al, 2004).

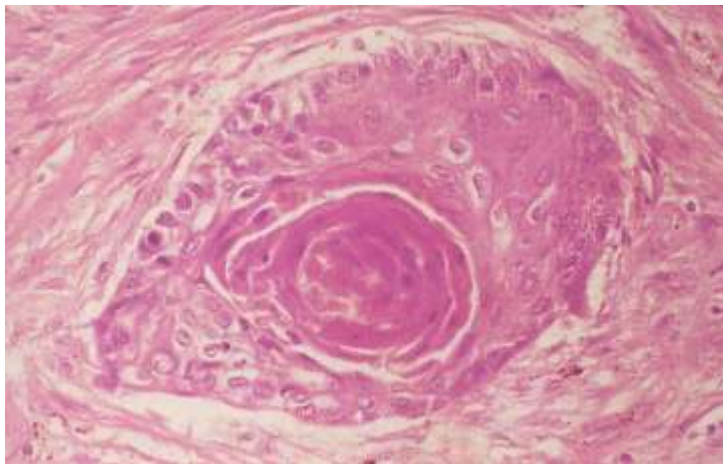


Figura 4: Aspecto histológico do Carcinoma escamocelular oral. CONTRAN et al, 2005.

Inúmeros fatores influenciam o prognóstico da doença, no entanto, o estadiamento clínico da lesão é o melhor indicador de prognóstico, sendo realizado pelo sistema TNM, onde o T significa extensão da lesão primária, N linfonodos envolvidos e M metástases a distância. Os vários aspectos de TNM são reunidos, para que se determine o estágio apropriado (I, II, III e IV). Quanto maior a classificação do estágio, pior o prognóstico, pois significa o envolvimento de linfonodos e a constatação de metástases (NEVILLE et al, 2004; UICC, 2004).

O carcinoma escamocelular oral é muito heterogêneo nos sítios acometidos, no comportamento biológico e na resposta ao tratamento. Na prática clínica o planejamento do tratamento e o prognóstico desta forma de câncer são baseados principalmente na classificação TNM, embora existam evidências crescentes que esta forma de classificação, apesar de sua grande importância no que tange ao planejamento terapêutico, é insuficiente para prever o prognóstico dos pacientes (JAYASURYA et al, 2005).

O tratamento do câncer de boca é preferencialmente cirúrgico, podendo ou não ser complementado pela radioterapia, dependendo do local e extensão do tumor primário e do status dos linfonodos cervicais. Desde que as lesões sejam diagnosticadas o mais precocemente possível, o tratamento pode ser efetuado com maior possibilidade de sucesso, alcançando-se, assim, um prognóstico favorável (PARISE JR, 2000; NEVILLE et al, 2004).

No entanto, ainda se observa um número crescente de pacientes que chegam aos serviços com a doença já em fase avançada; aproximadamente, 60% chegam aos hospitais especializados com o câncer de boca nos estágios III e IV, cujo tratamento torna-se mais difícil, causando nos casos de sobrevivência desfiguração, disfunção e trauma psicológico, interferindo, dessa forma, na qualidade de vida do indivíduo (KERDPON & SRIPLUNG, 2001).

2.2.1 Epidemiologia

De acordo com dados da OMS, as neoplasias malignas da boca ocupam a 8ª posição entre as mais freqüentes no mundo, no entanto a sua incidência é extremamente variável. Em alguns países da Ásia hábitos locais, como mascar folhas de bétela e tabaco, fazem com que a taxa de incidência de câncer de boca seja muito superior em relação a outras áreas do mundo. Na Índia, por exemplo, a taxa de incidência de câncer de boca para cada cem mil habitantes é de 12,6 - número superior à média mundial que varia entre 1 à 10 (WORLD HEALTH REPORT, 2003).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou que no ano de 2006 surgiriam 13.470 novos casos de neoplasias malignas de boca, sendo

10.060 no sexo masculino e 3.410 no sexo feminino. Esses números colocam o câncer de boca como o quinto tipo de câncer mais freqüente entre os homens e o sétimo entre as mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Nos Estados Unidos, foram esperados para o ano de 2005, 29.370 novos casos de câncer de boca, com 19.100 casos entre os homens e 10.270 entre as mulheres (JEMAL et al, 2005).

A taxa de mortalidade para neoplasias malignas de boca, no período de 1979 a 1998 no Brasil, variou de 2,16 para 2,96 a cada 100.000 homens e de 0,48 para 0,70 a cada 100.000 mulheres, representando aumento dessas taxas em 37% e 46,8%, respectivamente para homens e mulheres. No ano de 2003 o INCA estimou 3245 óbitos por câncer de boca no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002). Nos Estados Unidos, foram estimados para o ano de 2005, 5190 mortes devido a neoplasias malignas da boca, sendo 3420 entre os homens e 1770 entre as mulheres (JEMAL et al, 2005).

Com relação à sobrevida, os pacientes em geral apresentam uma taxa de cinco anos isentos de recidiva da doença em apenas 20 a 30% dos casos, principalmente para os tumores de língua e assoalho de boca. Nas lesões labiais, a taxa de cinco anos isentos de recidiva é em torno de 90% (CONTRAN et al, 2005).

Estudos epidemiológicos relatam que a incidência do câncer de boca varia de acordo com a idade, sexo, raça e localização anatômica. As faixas etárias mais atingidas pela doença são aquelas acima dos 50 anos, sendo o sexo masculino o mais atingido. A proporção de casos entre homens e mulheres é de 3:1, no entanto, a literatura relata que essa proporção entre os sexos deverá diminuir consideravelmente com o passar do tempo, devido ao

fato das mulheres terem modificado seus hábitos e costumes, principalmente com relação ao uso do fumo e álcool, principais fatores de risco para o desenvolvimento desta forma de câncer (JITOMIRSKI, 2000). No que concerne à raça os indivíduos brancos são os mais afetados, representando cerca de noventa e dois por cento dos casos de câncer de boca. Quanto à localização anatômica o lábio inferior, a borda lateral da língua e assoalho bucal são os sítios mais freqüentemente acometidos (TAVARES & NOMA, 1997; ELIAS et al, 2002; TOMMASI, 2002; NEVILLE, 2004).

2.2.2 Etiologia

A etiologia do Carcinoma escamocelular oral ainda não está completamente estabelecida. Acredita-se que, assim como nas outras formas de câncer, exista uma interação de diversos fatores etiológicos, genéticos e ambientais. Os fatores etiológicos ambientais subdividem-se em agentes químicos, físicos e biológicos (NEVILLE, 2004; SOUSA et al, 2004).

De acordo com TODD et al, (1997), as alterações cromossômicas mais frequentemente relacionadas ao carcinoma oral de células escamosas são encontradas nos cromossomos 1, 3, 9, 11, 13, 14, 15 e 18. CALIFANO, et al (1996) propuseram a perda do braço curto do cromossomo 9, no epitélio caracterizado morfológicamente como hiperplásico, como um evento inicial da carcinogênese. Os mesmos autores relacionaram a perda do braço curto dos cromossomos 3 e 17 com a transição do epitélio hiperplásico para displásico. Perdas adicionais dos braços longos dos cromossomos 11, 13 e 14 foram detectadas no carcinoma *in situ*, enquanto a perda do braço curto do cromossomo 6, de todo o cromossomo 8 e do braço longo do cromossomo 4

promoveria a invasão da lesão maligna nos tecidos. Ainda não se conhece o exato significado dessas alterações na carcinogênese bucal, entretanto acredita-se que levariam à mutações de genes responsáveis pela proliferação, crescimento e morte das células.

Em relação aos fatores ambientais, entre os agentes químicos, o tabaco destaca-se como um dos principais fatores etiológicos, devido ao fato de possuir entre as 2500 diferentes substâncias presentes em sua composição, 300 substâncias consideradas carcinógenas. Entre as quais se destacam as nitrosaminas específicas do tabaco e os hidrocarbonetos policíclicos. Essas substâncias quando metabolizadas dão origem a compostos hidrofílicos reativos capazes de produzirem danos ao DNA das células (JOHNSON, 2001; DAS & NAGPAL, 2002; KUPER et al, 2002).

A freqüente ingestão de bebidas alcoólicas também é um fator etiológico importante, no entanto não existe um consenso sobre sua ação. Acredita-se que o álcool leve a deficiências nutricionais e imunológicas que permitam que o organismo seja mais suscetível à ação de carcinógenos, assim como aumente a permeabilidade das células aos carcinógenos presentes, principalmente, no tabaco (DAS & NAGPAL, 2002). Alguns estudos mostraram que o etanol é transformado em acetaldeído por bactérias da flora bucal e essa substância é capaz de produzir danos ao DNA das células (HOMANN et al, 1997).

O sinergismo entre tabaco e álcool aumenta em muito o risco de desenvolver uma neoplasia maligna da boca. Alguns estudos mostram que a associação entre essas duas substâncias aumenta em 50 vezes a chance de desenvolver câncer de boca, enquanto o tabaco isolado é responsável por um aumento de 20 vezes, e o álcool 5 vezes (HUNTER et al, 2005).

Em relação aos fatores biológicos, alguns fungos e vírus têm sido detectados em associação com o câncer oral. Entre esses vírus, o papiloma vírus humano (HPV) tem sido detectado com frequência crescente no epitélio oral carcinomatoso, em comparação com a mucosa oral normal (MILLER, 1994; MILLER & WHITE, 1996; FRANCESCHI, 2000; ZUR HAUSEN, 2000; MILLER, 2001; KANSKY, 2003; HERMANN et al, 2004; VIDAL, 2004). Entretanto, o papel deste vírus na carcinogênese oral ainda é controverso, com alguns estudos demonstrando a presença viral e sua correlação com a carcinogênese (MILLER & WHITE, 1996; MCGLENNEN, 2000; SCULLY et al, 2000; MILLER & JOHNSTONE, 2001; TINOCO et al, 2004; BOY et al, 2006), enquanto outros estudos não consideram sua participação no câncer oral (MIGUEL et al, 1998; CHANG et al, 2002; PATRICK et al, 2002). No entanto, a presença na mucosa oral dos subtipos anogenitais, HPV 6/11 e 16/18, podem significar transmissão oro genital, o que torna este vírus um importante co-fator no desenvolvimento do câncer oral assim como é considerado no carcinoma de cérvix uterino (SYRJANEN et al, 1987; PALEFSK et al, 1995; WALBOOMERS, 1999; MILLER & JOHNSTONE, 2001).

2. 3 Papiloma bucal e HPV

O papiloma escamoso da cavidade oral é uma neoplasia epitelial benigna que pode ocorrer em qualquer idade. Clinicamente manifesta-se como uma lesão nodular globosa, única ou múltipla, filiforme, pediculada, de coloração avermelhada ou esbranquiçada, quando queratinizada, superfície opaca e textura áspera, com pequena dimensão (Figura 5). Os sítios mais comumente acometidos são o dorso da língua, mucosa labial e palato duro.

Histopatologicamente, o papiloma apresenta-se como uma papilomatose, podendo ser definida como projeções epiteliais finas e digitiformes sustentadas por eixos fibrovasculares centrais e recobertas por epitélio escamoso estratificado ordenado e típico (SHAFER et al, 1987; REGEZI, 1993; BORAKS, 1996; TOMMASI, 2002; CONTRAN et al, 2005).

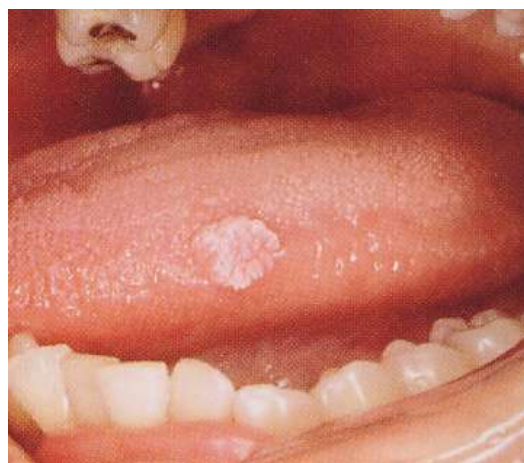


Figura 5 - Aspecto clínico do papiloma em língua (BORAKS, 1996).

Sua etiologia pode estar associada a traumatismo crônico de baixa intensidade, com alguns casos de origem virótica associada ao HPV, sendo os subtipos 6 e 11 os mais frequentemente associados a essa forma benigna de neoplasia, embora subtipos oncogênicos, tal como o HPV-16, também possam estar a ela relacionados. Demonstrando, nesses casos, um risco potencialmente maligno desta lesão. Principalmente quando a esse fator etiológico viral somam-se outros fatores de risco para o câncer oral, já citados anteriormente (SYRJANEN et al, 1987; BORAKS, 1996; TOMMASI, 2002; CONTRAN et al, 2005).

Devido à sua importância médica, o HPV tem sido extensivamente estudado, estando associado a uma variedade de patologias, sendo capaz de

causar lesões em mucosas urogenitais e bucorespiratórias produzindo proliferações epiteliais características no sítio de infecção. São espécies, e quase sempre tecido e sítio específicos, sendo cada tipo associado a processos histopatológicos distintos (DESAINTES et al, 1997; FONSECA & CARMO, 2000).

A associação entre lesões malignas e infecção pelo HPV no epitélio genital masculino e feminino já é conhecida, sendo considerado como agente causal inequívoco do câncer de colo uterino (SYRJANEN et al, 1987; XAVIER et al, 2005). Na cavidade oral, esses vírus estão associados ao desenvolvimento de lesões como a verruga vulgar, papiloma, condiloma acuminado e a hiperplasia epitelial focal e seu interesse cresceu enormemente a partir do momento em que foram associados a lesões malignas orais, especialmente ao carcinoma oral de células escamosas (CHANG et al, 1991; REGEZI & SCIUBBA, 1991; MILLER & WHITE, 1996; SNIJDERS et al, 1997; SHIMA et al, 2000; ZUR HAUSEN, 2000; SCULLY, 2001; OLIVEIRA et al, 2003; CASTRO et al, 2004).

Os papilomas vírus (PV) são membros da família Papovaridae, que também inclui o vírus polioma. São vírus pequenos não envelopados medindo 45-55 nm de diâmetro e com genoma de aproximadamente 7200-8000 pares de base (pb). Possuem capsídeo icosaédrico composto de 72 capsômeros, envolvendo DNA genômico circular de fita dupla (PFISTER & FUCHS, 1994; BOUDA et al, 2000; SCULLY, 2001; TERAJ & TAKAGI, 2001; ROSENBLATT, 2005).

O genoma do Papilomavírus é constituído por dois segmentos principais, sendo cada um constituído por uma série de regiões ou *opening reading*

frame (ORFs), que codificam as proteínas virais. Este genoma pode ser dividido em três regiões; as regiões precoces “*early*” (E: E1 - E7), e tardias “*later*” (L: L1 e L2), responsáveis pelos processos iniciais e finais de replicação, respectivamente, e a região LCR (região longa de controle), que compreende 10% do seu genoma (KIRNBAUER et al, 1993; ZUR HAUSEN, 1996; TERAJ & TAKAGI, 2001).

As regiões E são expressas logo no início da infecção, sendo responsáveis pelos mecanismos de regulação da síntese de DNA. Essas regiões E são expressas em células infectadas, além de células transformadas. Já as regiões L expressas nos estágios posteriores da infecção codificam as proteínas do capsídeo viral. As proteínas L1 e L2 são utilizadas na adesão celular entre o vírus e as diversas células teciduais (ZUR HAUSEN, 1996). A LCR, ou região não codante, varia de tamanho entre os papilomavírus, sendo esta região responsável pelo controle da expressão genética e processos como transcrição e replicação viral (ZUR HAUSEN, 1996; ROSENBLATT, 2005) (Figura 6).

O HPV é um vírus que se multiplica exclusivamente no núcleo das células infectadas (SARRUF & DIAS, 1997; TERAJ et al, 2001). Os receptores pelos quais os papilomavirus se ligam e penetram nas células ainda não foram completamente identificados. Estudos recentes indicam que a expressão de integrinas, presentes na superfície de células basais seriam candidatos a receptores do vírus do papiloma. O genoma do HPV, nas células basais e parabasais se estabelece como epissoma, replicando-se, como acontece nas lesões benignas e pré-invasivas em baixo padrão (DOORBAR, 2005; ROSENBLATT et al, 2005) e apenas genes envolvidos nos processos iniciais

da infecção são transcritos, como o E5, E6 e E7. Multiplicação extensiva do DNA viral e transcrição de todos os genes, bem como a formação do capsídeo viral (L1 e L2) ocorre apenas nas camadas suprabasais. Partículas virais maduras estão, portanto, ausentes nas células basais, e a replicação produtiva do DNA está restrita às células do estrato espinhoso e granuloso (CHANG et al, 1991).

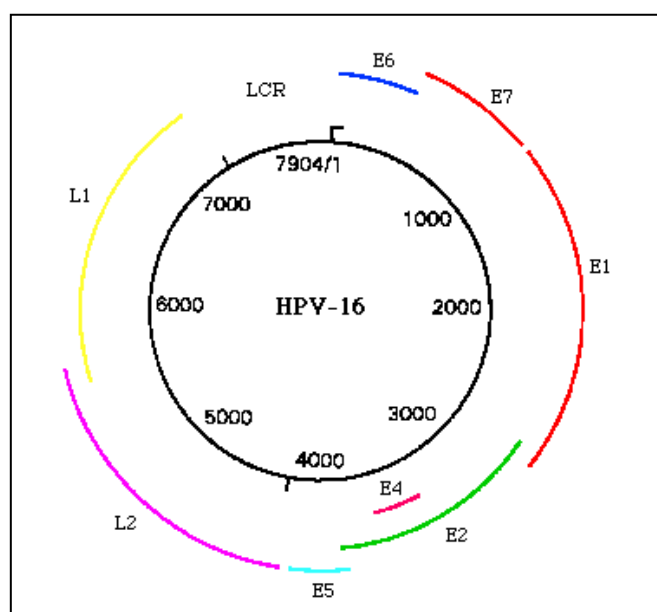


Figura 6: Genoma do HPV-16 (GUTIERREZ & GARZA, 2001).

As lesões causadas pelo HPV dependem do tipo do vírus, além da região da camada epitelial em que ele permanece. Os HPV de baixo risco, geralmente replicam-se apenas nas camadas inferiores do epitélio estratificado, enquanto os ceratinócitos estão passando por divisão celular. Em contraste, os HPVs de alto risco tem o seu genoma integrado ao DNA e se replicam nas camadas mais altas do epitélio, quando os ceratinócitos entram completamente no processo de diferenciação terminal. Desta forma, os tipos virais de alto risco

podem estimular as células a replicar o DNA em meios não-habituais em maiores proporções do que os tipos de baixo risco (TOMAS et al, 1999; ROSENBLATT et al, 2005).

As proteínas E6 e E7 são as principais responsáveis pela transformação celular mediada pelos HPVs de alto risco que atuam na modulação de atividades de proteínas celulares que regulam o ciclo celular (SYRJÄNEN & SYRJÄNEN, 1999; SOUTHERN & HERRINGTON, 2000; ROSENBLATT et al, 2005). O gene L1 regula os níveis de expressão das proteínas virais E6 e E7, importantes na tumorigênese, devido a interação e inativação das funções supressoras das proteínas p53 e pRb (ZUR HAUSEN, 1996).

A propriedade de imortalização não se verifica nas infecções causadas pelo HPV de baixo risco. Os genes E6 e E7 dos HPVs de alto risco são juntos necessários e suficientes para imortalização de células epiteliais escamosas primárias, enquanto que as E6 e E7 codificadas pelos HPVs de baixo risco estão ou inativas ou fracamente ativadas na mesma amostra . Os genes E6 e E7 estão invariavelmente expressos em lesões malignas cervicais HPV positivas (FRANCIS et al, 2000).

Mais de 100 tipos de HPV já foram identificados, sendo na cavidade oral, 24 tipos (HPVs-1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 45, 52, 55, 57, 59, 69, 72 e 73) associados com lesões benignas e 12 tipos (HPVs-2, 3, 6, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 57) com lesões malignas. Entre esses subtipos os HPV-6 e HPV-11 têm um baixo risco de associação com malignidade e são chamados de benignos ou de baixo risco, enquanto outros tais como HPV-16 e HPV-18 são fortemente associados com malignidade e são chamados de malignos ou oncogênicos ou de alto risco, sendo comprovadamente

carcinogênicos estando associados à produção das oncoproteínas E6 e E7 produzidas pelos mesmos (TERAI & BURK, 2001; TERAJ & TAKAGI, 2001).

O E6 é um dos principais genes expressos na infecção pelo HPV e este possui um papel importante na imortalização celular. A atividade transformadora da oncoproteína E6 é dependente da sua ligação com a proteína supressora de tumor p53. A E6 liga-se, seqüestra e degrada fisiologicamente a p53 por uma via ubiquitina-dependente (CROOK & VOUSDEN, 1994; SUGERMAN & SHILLITOE, 1997). Esse fenômeno interfere de maneira relevante nos mecanismos de apoptose e reparo de DNA (RAPP & CHEM, 1998). A formação do complexo E6-p53 é fundamental para a inativação das funções supressoras da p53. Essa parece ser uma atividade específica dos HPVs de alto risco, pois os HPVs de baixo risco codificam E6 que não inativam a p53 pelo mesmo mecanismo (WERNESS et al, 1990).

Por outro lado a E7 se liga e seqüestra a pRb, induzindo a sua degradação, fato observado devido à redução da meia-vida desta proteína em células expressando HPVs de alto risco. A E7 ligada a pRb, preferencialmente na forma ativa, facilita a liberação de E2F, promovendo, desta forma, a progressão do ciclo celular, atuando nas fases G1 e S, o que pode eventualmente propiciar o desenvolvimento do câncer (BOYER et al, 1996). A E7 dos HPVs de baixo risco ligam-se a pRb com baixa afinidade, enquanto a E7 dos HPVs de alto risco ligam-se com alta afinidade a pRb (LEE et al, 1998).

Os subtipos HPV oncogênicos 16, 18, 31 e 33 são os mais fortemente associados ao carcinoma oral de células escamosas (KUI et al, 2003; SUGIYAMA et al, 2003; SMITH et al, 2004; ZHANG et al, 2004). No papiloma, os subtipos não oncogênicos 6 e 11 são os mais frequentemente envolvidos.

Embora subtipos oncogênicos, tais como HPV-16 HPV-18, também estejam associados a essa lesão, porém em menor frequência (SYRJANEN et al, 1987; SARRUF & DIAS, 1997; NASSIF & BÓROS, 2003; OLIVEIRA et al, 2003; CHEN et al, 2006).

Alguns tumores benignos induzidos pelo HPV apresentam regressão espontânea, enquanto outros persistem ou sofrem transformação maligna. O mesmo tipo de HPV pode determinar lesões benignas ou malignas, dependendo das condições imunológicas (outras) do hospedeiro (JACYNTHO et al, 1994). Os papilomas, apesar de serem considerados tumores benignos, e ter na maioria dos casos um prognóstico bom, fazem parte das lesões com potencial de malignização, principalmente nos casos de etiologia viral pelo HPV, sobretudo quando recidivados ou quando ulcerados, independente do tamanho, volume, localização ou idade (ZEGARELLI, 1982; LITTLE, 1988). PAZ (1997), identificou a presença do HPV-6, considerado um subtipo de baixo risco para o desenvolvimento do câncer, em 50% dos carcinomas de tonsilas e em 15% por cento dos carcinomas de língua. Portanto, o potencial maligno de lesões benignas, nas quais é identificado a presença de subtipos de HPV de baixo risco, deve ser considerado.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionadas 116 biópsias da cavidade oral, entre janeiro de 2002 e dezembro de 2005, do Laboratório de Anatomia Patológica Silvano Studart do Hospital Português. Destas, 60 biópsias foram escolhidas para o estudo, assim distribuídas: 5 normais, 18 papilomas de células escamosas e 37 carcinomas de células escamosas.

O estudo imunoistoquímico foi feito em secções de tecido emblocado em parafina. Foram utilizados cortes com 4 μ de espessura, montados em lâminas passadas previamente em solução adesiva (poli-lisina, 1:20). A técnica utilizada foi a Streptoavidina-biotina. (Ver a técnica no Anexo).

Dois patologistas (CQ e ES) analisaram a imunoistoquímica separadamente. A reação foi considerada positiva para p16^{INK4a} quando se observou a coloração castanha no núcleo e citoplasma, sendo as amostras classificadas de acordo com o *score*: 0. sem reação; 1. reação fraca; 2. moderada e 3. forte.

A detecção do papiloma vírus humano (HPV) será feita através da realização da Reação de Polimerização em Cadeia (PCR), o DNA será extraído dos cortes de parafina e será amplificado pela técnica do PCR. O produto desnaturado dessa reação será aplicado em gel de Poliacrilamida para eletroforese (SSCP- análise de conformação de fita simples).

Para a amplificação do DNA, através da técnica de PCR, serão utilizados os iniciadores MY09 e MY11, os quais amplificam especificamente uma parte do gene L1, que é a região mais conservada no genoma dos diferentes tipos de HPV, codificando uma proteína do capsídeo viral. Esses iniciadores são capazes de amplificar um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases (pb) do gene L1, tornando possível a detecção da maioria dos tipos de HPV. A reação de amplificação será realizada em um volume final de 100 μ L, sendo constituída por 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2,5 mM de MgCl₂, 200 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 12,5 pmoles de cada iniciador e 3 U de Taq DNA polimerase. Para cada reação de amplificação, serão utilizados 5 μ L da solução, contendo o DNA já extraído anteriormente. Em cada

bateria de amplificação pela PCR, será utilizado um controle negativo, constituído pelas mesmas concentrações e pelos mesmos reagentes da reação de amplificação, exceto o DNA. O sistema de amplificação do DNA será realizado em tubos de 500 µL, que serão transferidos para o termociclador (MJ Research PTC 150). O programa de PCR consistirá das seguintes etapas: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação (95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto) e 72°C por 5 minutos (KANESHIMA et al., 2001).

NA atual fase de desenvolvimento do projeto o PCR encontra-se em fase final de padronização. E será realizado no Hospital Professor Edgar Santos (Hospital das Clínicas) da Universidade Federal da Bahia.

IV. RESULTADOS

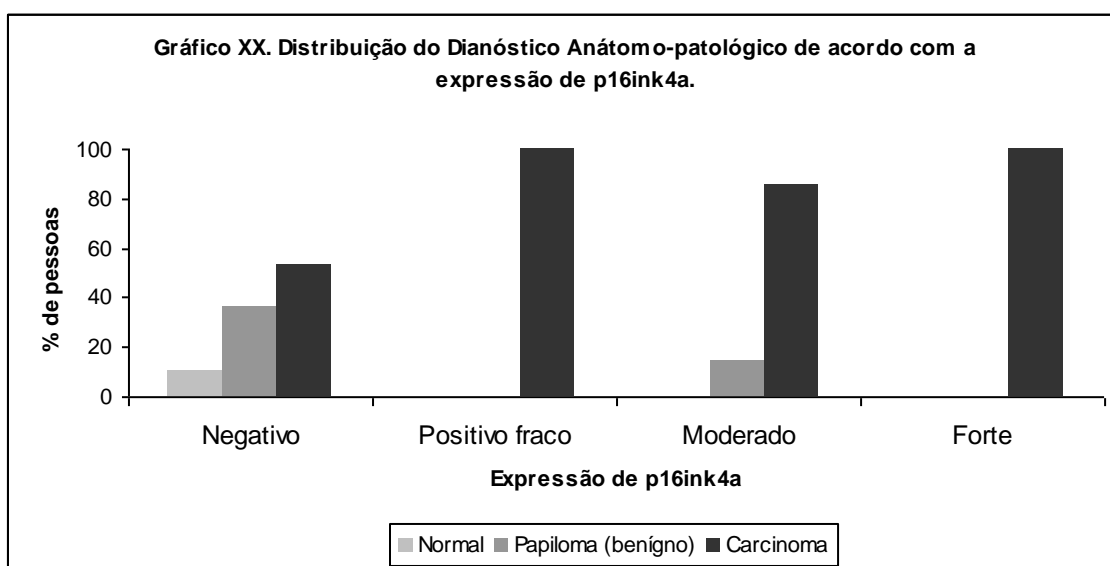
A Tabela 1 e o Gráfico 1 mostram a distribuição do diagnóstico

Anatomopatológico de acordo com a expressão de p16^{INK4a}.

Tabela 1. Distribuição do diagnóstico Anátomo-patológico de acordo com a expressão de p16^{INK4a}.

Variáveis	Diagnóstico Anátomo-patológico							
	Normal		Papiloma		Carcinoma		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
	5		18		37		60	
Expressão de p16^{INK4a}								
Negativo	5	100,0	17	94,4	25	67,6	47	78,3
Positivo fraco	0	---	0	---	1	2,7	1	1,7
Moderado	0	---	1	5,6	6	16,2	7	11,7
Forte	0	---	0	---	5	13,5	5	8,3

Gráfico 1. Distribuição do diagnóstico Anátomo-patológico de acordo com a expressão de p16^{INK4a}.



Verificou-se, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis que a expressão de p16^{INK4a} não difere quanto ao diagnóstico anátomo-patológico (p-valor = 0,0816 > 0,05). Verificou-se também a ocorrência de apenas um caso de p16^{INK4a} “positivo fraco” entre as amostras.

Nas lesões carcinomatosas a expressão imunohistoquímica da p16^{INK4a} (Figuras 1, 2 e 3) não apresentou significância estatística, evidenciando desta forma a ausência da participação desta proteína na carcinogênese oral. Não houve também resultado estatisticamente relevante nas lesões papilomatosas. Os resultados obtidos, até o presente momento estão de acordo com alguns trabalhos citados na literatura, tais como os de GUERRA, et al (2005) e AI, et al (2003), que encontraram resultados semelhantes aos nossos.

Podemos inferir que não parece ser útil à prática clínica o estudo da expressão imunohistoquímica da p16^{INK4a} como biomarcador de risco na carcinogênese oral.

Portanto, uma nova categorização desta expressão poderia ser considerada.

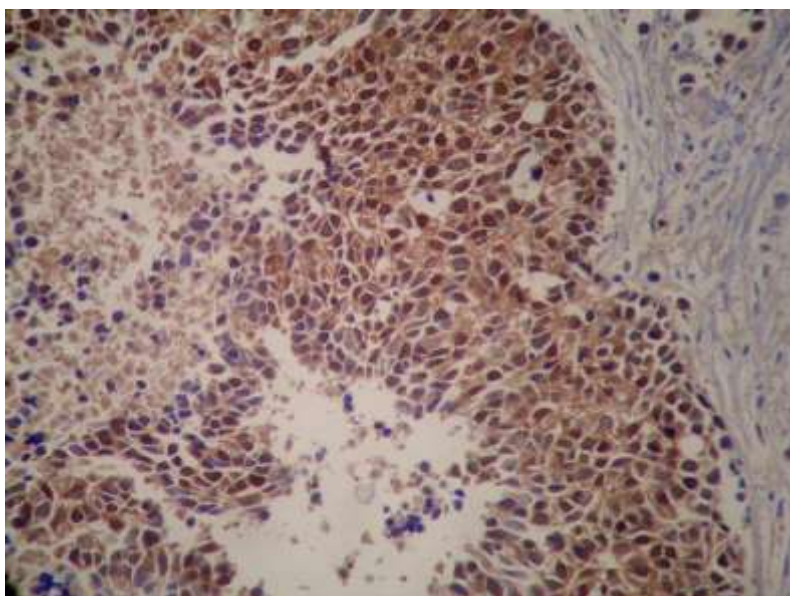


Figura 1. Caso 37. Carcinoma de células escamosas, fortemente positivo (score 3) para p16^{INK4a}

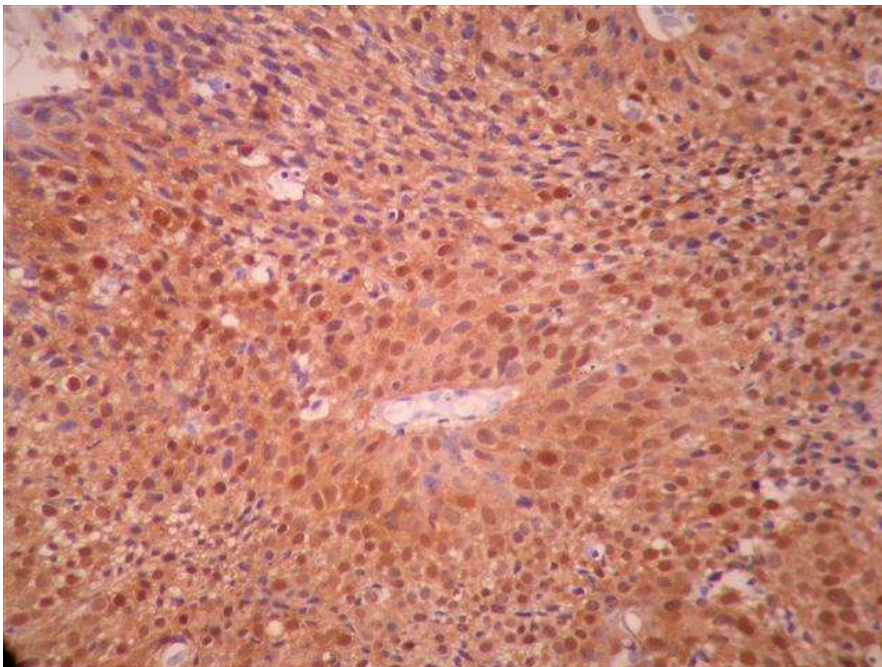


Figura 2. Caso 9. Carcinoma de células escamosas, fortemente positivo (score 3) para p16^{INK4a}

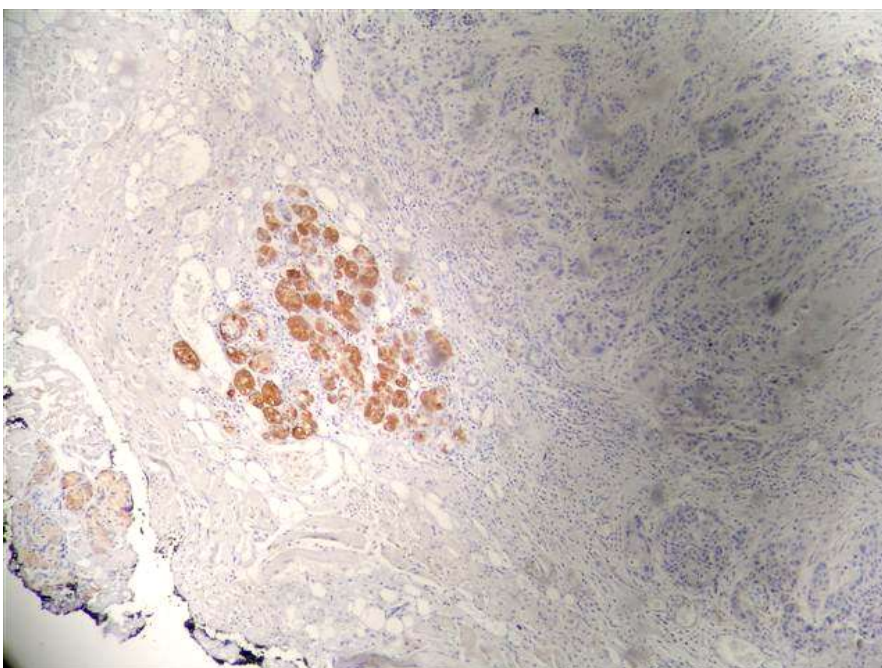


Figura 3. Caso 4. Carcinoma de células escamosas, negativo (score 0) para p16^{INK4a} à direita, e glândulas positivas (controle positivo interno).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AH-SEE KW, COOKE TG, PICKFORD IR, SOUTAR D, BALMAIN A. An allelotype of squamous carcinoma of head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res*, 54: 1617-1621, 1994.
- AI L, STEPHENSON KK, LING W, ZUO C, NUKUNYADZIC P, SUEN JY, HANNA E, FAN CY. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol*, 16(9): 944-50, 2003.
- ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P. *Molecular Biology of The Cell*, Garland Science, 2002.
- BARNES LD, GARRISON PN, SIPRASHVILI Z, GURANOWSKI A, ROBINSON AK, INGRAM SW, CROCE CM, OHTA M, HUEBNER K. FHIT a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5', 5'''-P¹,P³-triphosphate hydrolase. *Biochemistry*, 35: 11529-11535, 1996.
- BRENNER C, BIEGANOWSKI P, PACE HC, HUEBNER K. The histidine triad superfamily of nucleotide-binding proteins. *J Cell Physiol*, 181: 179-187, 1999.
- BLOT WJ, McLAUGHLIN JK, DEVESA SS, FRAUMENI Jr JE. *Cancer Epidemiology and Prevention*. New York: Oxford, 666-680, 1996.
- BORAKS S. *Diagnóstico Bucal*. São Paulo: Artes Médicas, 270-273, 1996.
- BOVA RJ, QUINN DI, NANKERVIS JS. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res*, 5(10): 2810-2819, 1999.
- BOUDA M, GORGOULIS V, KASTRINASKI NG, GIANNOUDIS A, TSOLI E, DANASSI-AFENTAKI D, FOUKAS P, KYROUDI A, LASKARIS G, HERINGTON CS, KITTAS C. "High Risk" HPV Types are Frequently Detected in Potentially Malignant and Malignant Oral Lesions, but not in Normal Oral Mucosa. *Mod Pathol*, 13: 644 – 653, 2000.
- BOY S, RENSBURG EJV, ENGELBRECHT S, DREYER L, HEERDEN MV, HEERDEN WV. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas – commensal, aetiological agent or contamination? *J Oral Pathol Med*, 35(2): 86–90, 2006.
- BOYER SN, WAZER DE, BAND V. E7 Protein of Human Papilloma Virus–16 Induces Degradation of Retinoblastoma Protein Through the Ubiquitin – Proteasome Pathway. *Cancer Res*, 56: 4620- 4624, 1996.

BRENNA SMF, SYRJANEN KJ. Regulation of cell Cycles is of Key Importance in Human Papillomavirus (HPV) – associated Cervical Carcinogenesis. *Revista Paulista de Medicina*, 121(3): 128 – 132, 2003.

BRUGAROLAS J, MOBERG K, BOYD SD, TAYA Y, JACKS T, LEES JA. Inhibition of Cyclin – Dependent Kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein – mediated G1 arrest after gamma – Irradiation. *Proc. Natl. Acad Sci USA*, 96: 1002 – 1007, 1999.

BURKE L, KHAN MA, FREEDMAN AN, GEMMA A, RUSIN M, GUINEE DG. Allelic deletion analysis of the Fhit gene predicts poor survival in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*, 58: 2533-36, 1998.

CADWELL C, ZAMBETTI GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain of function on cell growth. *Gene*, 277: 15-30, 2001.

CAIRNS P, POLASCIOK TJ, EBY Y, TOKINO K, CALFANO J, MERLO A, MAO L, HERATH J, JINKINO R, WESTRA W, RUTH JL, BUCKLER A, GABUELSON E, TOCKMAN M, CHOK R, MEDRICK L, BOVA GS, ISAACS W, KOCH W, SCHWAS D, SICHANSKY D. Frequency of homozygous deletions at P16/CDKN2. *Nat Genet*, 11: 210-212, 1995.

CALIFANO J, VAN DER RIET P, WESTRA W. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*, 56: 2488-2492, 1996.

CARVALHO C. Cresce a incidência de câncer de boca no Brasil. *Rev Bras Odontol*, 60(1): 36-39, 2003.

CASTRO TMPG, NETO CER, SCALA KA, SCALA W. Manifestações orais associada ao papilomavírus humano (hpv) conceitos atuais: revisão bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 70(4), 2004.

CHANG F, SYRJÄNEN S, KELLOKOSKI J, SYRJÄNEN K. Human papillomavirus (HPV) infection and their association with oral disease. *Journal Oral Pathology and Medicine*, 20: 305-417, 2002.

CHANG KM, KAO SY, TZENG RJ, LEE JL. Multiple molecular alterations of FHIT in betel-associated oralcarcinoma. *J Pathol*, 196: 3000-3006, 2002.

CHEN PC, PAN CC, KUO C, LIN, CP. Risk of oral nonmalignant lesions associated with human papillomavírus infection, betel quid chewing, and cigarret smoking in Taiwan: an integrated molecular and epidemiologic study. *Arch Pathol Lab Med*, 130(1): 57-61, 2006.

CONTRAN RS, KUMAR V, COLLINS T. Robbins Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 249-264,688-689, 2005.

CROOK T, VOUSDEN KH. Interaction of HPV E6 with p53 and associated proteins. *Biochem Soc Trans*, 22: 52–55, 1994.

CUPERLOVIC-CULF M, BELACEL N, OUELLETTE LJ. Determination of tumour marker genes from gene expression data. *Drug Discov Today*, 10(6): 429-437, 2005.

D'AGOSTINI F, IZZOTTI A, BALANSKY R, ZANESI N, CROCE CM, DE FLORA S. Early loss of Fhit in the respiratory tract of rodents exposed to environmental cigarette smoke. *Cancer Research*, 66: 3936-3941, 2006.

DAS BR, NAGPAL JK. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit*, 8(11): 258-267, 2002.

DEDIVITIS RA, FRANCA CM, MAFRA ACB, GUIMARÃES FT, GUIMARÃES AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 70(1): 35-40, 2004.

DE-PAULA AMB, CARDOSO SV, GOMEZ RS. Immunolocalization of TP53 and p16CDKN2 tumor suppressor genes proteins in invasive front of oral epidermoid carcinoma. *Bras Patol Med Lab*, 42(4): 285-291, 2006.

DeROBERTIS EMF, HIB J. Bases da Biologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

DESAINTES C, DEMERET C, GOYAT S, YANIV M, THIERRY F. Expression of the papillomavirus E2 protein in Hela cells leads to apoptosis. *EMBO J*, 16: 504-514, 1997.

DIAS EM. Tbx2 Is Overexpressed and Plays an Important Role in Maintaining Proliferation and Suppression of Senescence in Melanomas. *Cancer Research*, 65: 2260 – 2268, 2005.

DOORBAR J. The Papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, 32S: S7-S15, 2005.

DRUCK T, HADACZEK P, FU TB, OHTA M, SIPRASHVILI Z, BALFA R, NEGRINI M, VERONESE ML, ROSEN D, ROTHSTEIN J, MCCUE P, COTTICELLI MG, INOUE H, CROCE CM, HUEBNER K. Structure and expression of the human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Res*, 57: 504-512, 1997.

- ELIAS R, OLIVA FILHO A, BARINO B, ANDRADE T. Câncer bucal. J Bras Clin Odontol, 36(31): 25-28, 2002.
- FONSECA LMS, CARMO MAV. AgNORs in hyperplasia, papilloma and oral squamous cell carcinoma. Bras Dent T, 11 (2): 105-110, 2000.
- FRANCESCHI S. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. Oral oncol, 36(1): 471-475, 2000.
- FRANCIS DA, SCHMID SI, HOWLEY PM. Repression of integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cell. J Virol, 74: 2679-2686, 2000.
- FREGONESI PA, TERESA DB, DUARTE RA, NETO CB, OLIVEIRA MR, SOARES CP. P16^{INK4a} immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. J Histochem Cytochem, 51(10): 1291-1297, 2003.
- GONZALEZ MV, PELLO MF, ABLANEDO P, SUAREZ C, ALVAREZ V, COTO E. Chromosome 3p loss of heterozygosity and mutation analysis of the Fhit and β -cat genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Pathol, 51: 520-524, 1998.
- GOTTE K, HADACZEK P, COY JF, WIRTZ HW, RIEDEL F, NEUBAUER J. Fhit expression is absent or reduced in a subset of primary head and neck cancer. Anticancer Res, 20: 1057-60, 2000.
- GRANDIS JR, TWEARDY DJ. Elevated level of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. Cancer Res, 53: 3579-3584, 1993.
- GRUTTGEN A, REICHENZELLER M, JUNGER M. Detail gene expression analysis but not microsatellite marker analysis of 9p21 reveals differential defects in the INK4a gene locus in the majority of head and neck cancers. J Pathol, 194: 311-317, 2001.
- GUAN RJ, FU Y, HOLT PR. Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. Gastroenterology, 116: 1063-1071, 1999.
- GUERIN LA, HOFFMAN HT, ZIMMERMAN MB, ROBINSON RA. Decrease fragile histidine triad gene protein expression is associated with worse prognosis in oral squamous carcinoma. Arch Pathol Lab Med, 130(2): 158-164, 2006.

GUTIÉRREZ EIC, GARZA CHL. Papilomavirus Humano, *Biology Molecular y Patogeneses*. Revista Salud Publica y Nutricion, 2(2), 2001.

HAFKAMP HC, SPEEL EJ, HAESEVOETS A, BOT FJ, DINJENS WN, RAMAEKERS FC, HOPMAN AH, MANNI JJ. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer*, 107(3): 394-400, 2003.

HAYASHI SI, TANIMOTO K, HAJIRO-NAKANISHI K, TSUCHIYA E, HIGASHI Y, IMAI K, SUGA K, NAKACHI K. Abnormal FHIT transcripts in human breast carcinomas: a clinicopathological and epidemiological analysis of 61 japoneses cases. *Cancer Res*, 57: 1981-1985, 1997.

HEICHMAN KA, ROBERTS JM. Rules to replicate by. *Cell*, 79: 557-60, 1994.

HERMANN RM, FUZESI L, PRADIER O, CHRISTIANSEN H, SCHMIDBERGE, H. Presence of human papillomavirus-18 and Epstein-Barr virus in a squamous cell carcinoma of the tongue in a 20-year-old patient. Case report and review of the current literature. *Cancer Radiother*, 8 (4): 262-265, 2004.

HOMANN N, JOUSIMIES-SOMER H, JOKELAINEN K, HEINE R, SALASPURO M. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis*, 18(9): 1739-1743, 1997.

HUNTER KD, PARKINSON EK, HARRISON PR. Profiling early head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 5(2): 127-135, 2005.

HUNTER T. Oncoprotein networks. *Cell*, 88: 333, 1997.

ISHII H, DUMON KR, VECCHIONE A, FONG LY, BAFFA R, HUEBNER K. Potential cancer therapy with the fragile histidine triad gene. Review of the preclinical studies. *Jama*, 286: 2441-2449, 2001.

ISHWAD CS, FERRELL RE, ROSSIE KM, APPEL BN, JOHNSON JT, MYERS EN. Loss of heterozygosity of the short arm of chromosomes 3 and 9 in oral cancer. *Pred Oncol*, 69: 1-4, 1996.

JACYNTHO C, ALMEIDA FILHO G, MALDONADO P. HPV. *Infeção Genital Feminina e Masculina*. Rio de Janeiro: Revinter, 91-95, 1994.

JAYASURYA R, SATHYAN KM, LASKHMINARAYANAN K, ABRAHAM T, NALINAKUMARI KR, ABRAHAM EK, NAIR MK, KANNAN S. Phenotypic

alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. *Modern Pathology*, 18: 1056-1066, 2005.

JEFFRIES S, EELES R, GOLDFAR D. The Role of Genetic Factors in Predisposition to Squamous Cell Cancer of The Head and Neck. *Br J Cancer*, 79: 865 – 867, 1999.

JEMAL A, MURRAY T, WARD E, SAMUELS A, TIWARI RC, GHAFOR A. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, 1: 10-30, 2005.

JI L, FANG B, YEN N, FONG K, MINNA JD, ROTH JA. Induction of apoptosis and inhibition of tumorigenicity and tumor growth by adenovirus vector-mediated fragile histidine triad (FHIT) gene abnormalities. *Cancer Res*, 59: 3333-3339, 1999.

JITOMIRSKI F. *Saúde Bucal Coletiva*. São Paulo: Santos, 445-456, 2000.

JOHNSON N. Tobacco use and oral cancer: A global perspective. *J Dent Educ*, 5(4): 328-336, 2001.

JUAN LJ, SHIA W J, CHEN MH, YANG NM, SETO E, LIN YS, WU CW. Histone Deacetylases Specifically Down – Regulated p53 – Dependent Gene Activation. *J Biol Chem*, 275(27): 20436 – 20443, 2000.

KANSKY AA, POLJAK M, SEME K, KOCJAN BB, GALE N, LUZAR B. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinoma and in normal oral mucosa. *Acta Virol*, 47(1): 11-16, 2003.

KEATING JT, CVIKO A, RIETHDORF S, RIETHDORF L, QUADE BJ, SUN D, DUENSING S, SHEETS EE, MUNGER K, CRUM CP. KI 67, Cyclin E and p16 INK4a are complementary surrogate biomarkers for human papilloma virus – related cervical neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 25: 884-891, 2001.

KERDPON D, SRIPLUNG H. Factors related to advanced stage oral squamous cell carcinoma in Southern Thailand. *Oral Oncol*, 37: 216-221, 2001.

KIM MM, CALIFANO J. Molecular pathology of head and neck cancer. *Int J Cancer*, 112(4): 545-553, 2004.

KIM JS, KIM H, SHIM YM, HAN J, PARK J, PARK J, KIM DH. Aberrant methylation of the FHIT gene in chronic smokers with early stage squamous cell carcinoma of the lung. *Carcinogenesis*, 25(11), 2004.

KIRNBAUER R, TAUB J, GREENSTONE H, RODEN R, DURST M, GISSMANN L, LOWY DR, SCHILLER JT. Efficient Self Assembly of Human Papillomavirus Type 16 L1 and L1-L2 into Virus – Like Particles. *J Virol*, 67: 6929, 1993.

KISIELEWSKI AE, XIAO GH, LIU SC. Analysis of the FHIT gene its product in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncogene*, 17: 83-91, 1998.

KISSELEV LL, JUSTESEN J, WOLFSON AD, FROLOVA LY. Diadenosine oligophosphates (ApnA), a novel class of signalling molecules? *FEBS Lett*, 427: 157-163, 1999.

KLAES R, DENER A, FRIEDRICH T, RUDIGER R, HERRINGTIN S, JENKINS D, KURMAN R, SCHMIDT D, STOLER M, VON KNEBEL DOEBERITZ M. p16 INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intra epithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol*, 26: 1389-1399, 2002.

KRESTY LA, MALLERY SR, KNOBLOCH TJ, SONG H, LLOYD M, CASTO BC. Alterations of p16^{INK4a} and p14^{ARF} in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res*, 62: 5295-5300, 2002.

KUI LL, XIU HZ, NING LY. Condyloma acuminatum and human papilloma virus infection oral mucosa of children. *Pediatr Dent*, 25(2): 149-153, 2003.

KUPER H, ADAMI HO, BOFFETTA P. Tobacco use, cancer causation and public health impact. *J Intern med*, 251(6): 455-466, 2002.

LEE IL, JEAN-CHARLES S, HASSAN K, LIU D, TANG X, EL-NAGGAR A, HONG WK, MAO L. Loss of Fhit expression is a predictor of poor outcome in tongue cancer. *Cancer Research*, 61: 837-841, 2001.

LEE JO, RUSSO AA, PAVLETICH NP. Structure of retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to peptide from HPV E7. *Nature*, 391: 859-865, 1998.

LIMA CD, KLEIN MG, HENDRICKSON WA. Structure-based analysis of catalysis and substrate definition in the HIT protein family. *Science*, 278: 286-290, 1997.

LINGBAO AI, KRYSTAL KS, WENHUA L, CHUNLAI Z, SUEN JY, HANNA E. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Modern Pathology*, 16(9): 944-950, 2003.

LITTLE JW. Papillomaviruses: The Current Status in Relation to Oral Disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 65: 526 – 532, 1988.

LOEB KR, LOEB LA. Significance of Multiple Mutations in Cancer. *Carcinogenesis*, 21: 379 – 385, 2000.

MAESTRO R, GASPAROTTO D, VUKOSAVLJEVIC T, BARZAN L, SULFARO S, BOIOCCHI M. Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers. *Cancer Res*, 53: 5775-5779, 1993.

MAO L, FAN YH, LOTAN R, HONG WK. Frequent abnormalities of FHIT, a candidate tumor suppressor gene, in head and neck cancer cell lines. *Cancer Res*, 56: 5128-5131, 1996.

MATSUMOTO N, FUJII T, ISHIKAWA M, SAITO M, IWATA T, FUKUCHI T. p16^{INK4a} overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Human Pathol*, 34(8): 778-783, 2003.

MCGLENNEN RC. Human papillomavirus oncogenesis. *Clinics in Laboratory Medicine*, 20: 383-406, 2000.

MIGUEL RE, VILLA LL, CORDEIRO AC, PRADO JC, SOBRINHO JS, KOWALSKI LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *American Journal of Surgery*, 176: 428-429, 1998.

MILLER CS. Herpes simplex virus and Human papillomavirus infection of the oral cavity. *Seminars in Dermatology*, 13: 108-117, 1994.

MILLER CS, JOHNSTONE BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 91(6): 622-635, 2001.

MILLER CS, WHITE DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics*, 82: 57-68, 1996.

MINETA H, MIURA K, TAKEBAYASHI S, MISAWA K, UEDA Y, SUZUKI I, ITO M, WENNERBERG J. Low expression of fragile histidine triad correlates with high proliferation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 39(1): 56-63, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. Falando sobre o câncer de boca. 2002. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/publicações/falandosobrecancerdeboca.pdf>>. Acesso em: 06 fev. 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. Estimativa 2006. Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/versaofinal.pdf>>. Acesso em: 09 fev. 2020.

MORI M, MIMORI K, SHIRAISHI T, ALDER H, INOUE H, TANAKA Y, SUGIMACHI K, HUEBNER K, CROCE CM. Altered expression of FHIT in carcinoma and precarcinomatous lesions of the esophagus. *Cancer Res*, 60: 1177-1182, 2000.

MORTIER L, MARCHETTI P, DELAPORTE E, MARTIN E, THOMAS P, PIETTE F. 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*, 176: 205-214, 2002.

MURPHY GA, HALLIDAY D, MCLENNAN AG. The Fhit tumor suppressor protein regulates the intracellular concentration of diadenosine triphosphate but not diadenosine tetraphosphate. *Cancer Res*, 60: 2342-2344, 2000.

Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F. p16^{INK4a} as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol*, 56(1): 56-63, 2003.

NAGPAL JK, DAS BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol*, 39: 213-221, 2003.

NAWROZ H, VAN DER RIET P, HRUBAN RH, KOCH W, RUPPERT RJ, SIDRANSKY D. *Cancer Res*, 54: 1152-1155, 1994.

NEVILLE BW, DAMM DD, ALLEN CME, BOUQUOT JE. *Patologia oral & Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 252-313, 2004.

NICULESCU AB, CHEN X, SMEETS M, HENGST L, PRIVES C, REED SI. Effects of p21 (Cip1- Waf1) at Both the G1 and The G2-M Cell Cycle Transitions: pRb is a Critical Determinant in Blocking DNA Replication and in Preventing Endoreduplication. *Mol Cell Biol*, 18: 629 – 643, 1998.

OHTA M, INOUE H, COTTICELLI MG, KASTURY K, BAFFA R, PALAZZO J, SIPARASHVILI Z, MORI M, McCue P, DRUCK T, CROCE CM, HUEBNER K. The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell*, 84: 587-597, 1996.

OLIVEIRA MC, ANDRADE MC, SOARES RC, COSTA ALL. Aspectos morfológicos que sugerem a presença do papilomavírus humano (HPV) em lesões do epitélio de revestimento da cavidade oral. *Revista Brasileira de Patologia Oral*, 2(2): 34-43, 2003.

PACE HC, GARRISON PN, ROBINSON AK, BARNES LD, DRAGANESCU A, ROSLER A, BLACKBURN GM, SIPRASHVILI Z, CROCE CM, HUEBNER K, BRENNER C. Genetic, biochemical, and crystallographic characterization of Fhit-substrate complexes as the active signaling form of Fhit. *Proc Natl Acad Sci*, 95: 5484-5489, 1998.

PALEFSK JM, SILVERMAM S, ABDEL-SALAAM M, DANILES T, GREENSPAN JS. Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16. *Oral Pathology Medicine*, 24:193-197, 1995.

PANDE P, MATHUR M, SHUKLA NK, RALHAN R. pRb and p16 proteins alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol*, 34: 396-403, 1998.

PAPADIMITRAKOPOULOU V, IZZO J, LIPPMAN SM, LEE JS, FAN YH, CLAYMAN G. Frequent inactivation of p16^{INK4a} in oral premalignant lesions. *Oncogene*, 14: 1799-1803, 1997.

PARADISO A, RANIERI G, STEA B, ZITO A, TOMMASINO M, GRAMMATICA L. Altered p16^{INK4a} and Fhit expression in carcinogenesis and progression of human oral cancer. *International Journal of Oncology*, 24: 249-255, 2004.

PARISE JR O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier, 2000.

PARTRIDGE M, EMILION G, PATEROMICHELAKIS S, PHILLIPS E, LANGDON L. Location of candidate tumour suppressor gene loci at chromosome 3p, 8p and 9p for oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer*, 83: 318-325, 1999.

PATEROMICHELAKIS S, LEE G, LANGDON LD, PARTRIDGE M. The FHIT gene in oral squamous cell carcinoma: allelic imbalance is frequent but cDNA aberrations are uncommon. *Oral Oncol*, 36: 180-188, 2000.

PATRICK K, PAI SI, WESTRA WH, GILLISON ML, TONG BC, SIDRANSKY D, CALIFANO JA. Real-time quantitative demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clinical Cancer Research*, 8: 1203-1209, 2002.

- PAZ IB. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer*, 79: 595, 1997.
- PFISTER H, FUCHS PG. Anatomy, taxonomy and evolution of papillomavirus. *Intervirology*, 37: 143-149, 1994.
- PIETONG C, EKALAKSANANAN T, SWADPANICH U, KONGYINGYOE B, KRITPETCHARAT O, YUENYAO P. Immunocytochemical detection of p16^{INK4a} protein in scraped cervical cells. *Acta Cytol*, 47(4): 616-623, 2003.
- PIGNATARI SS, WEEKX LL, BORDASCH A. Biologia Molecular no Diagnóstico das Infecções por Papilomavirus Humano (HPV) em Otorrinolaringologia. *Rev Bras Otorrinolaringologia*, 61(2): 91-5, 1995.
- PLUQUET O, HAINAUT P. Genotoxic and Non-Genotoxic Pathways of p53 Induction. *Cancer Lett*, 174: 01-15, 2001.
- QUEIROZ C, SILVA TC, ALVES VAF, VILLA LL, COSTA MC, TRAVASSOS AG, ARAÚJO FILHO JB, STUDART E, CHETO T, FREITAS LAR. Comparative study of the expression of cellular cycle proteins in cervical intraepithelial lesions. *Pathology – Research and Practice*, 202: 731-37, 2006.
- RAPP L, CHEN JJ. The Papillomavirus E6 Proteins. *Bioch Biophy Acta*, 1378: 01-19, 1998.
- REED AI, CALIFANO J, CAIRNS P, WESTRA WH, JONES RM, KOCH W. High frequency of p16(CDKN2/MTS1/INK4a) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 56: 3630-3, 1996.
- REGEZI JÁ, SCIUBBA JJ. *Patologia Bucal: Correlações Clínico patológicas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.
- ROSENBLATT C, WROCLAWSKI ER, LUCON AM, PEREYRA EAG. HPV na prática clínica. São Paulo: Atheneu, 1-42, 2005.
- REZNIKOFF CA, YEAGER TR, BELAIR CD. Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not E7, transformed human uro-epithelial cells. *Cancer Res*, 56: 2886-2890, 1996.
- RUBIN GRANDIS J, MELHEM MF, GOODING WE, DAY R, HOLST VA, WAGENER MM. Levels of TGF- α and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst*, 90(11): 824-832, 1998.

SAITO T, NAKAJIMA T, MOGI K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med*, 28: 226-32, 1999.

SARD L, ACCORNERO P, TORNIELLI S, DELIA D, BUNONE G, CAMPIGLIO M, COLOMBO M.P, GRAMEGNA M, CROCE CM, PIEROTTI MA, SOZZI G. The tumor-suppressor gene Fhit is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci*, 96: 8489-8492, 1999.

SARRUF MJB, DIAS EP. Avaliação citopatológica da cavidade bucal em pacientes portadores de infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV). *J Bras Doenças Sex Trans*, 9(2): 4-18, 1997.

SCHLIEPHAKE H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer – a review. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 32(3): 233-245, 2003.

SCULLY C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a vírus, to concern about possible sexual transmission. *Oral Oncology*, 38: 227-234, 2001.

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

SEGAWA T, SASAGAWA T, SAIJOH K, INOUE M. Clinicopathological significance of fragile histidine triad transcription protein expression in endometrial carcinomas. *Clin Can Res*, 6: 2341-48, 2000.

SHAFFER WG, HINE MK, LEVY IM. *Tratado de Patologia Bucal*. 4ed, Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, 80–212, 1987.

SHAHNAVAZ SA, BRADLEY G, REGEZI JA, THAKKER N, GAO L, HOGG D. Patterns of CDKN2A gene loss in sequential oral epithelial dysplasias and carcinomas. *Cancer Res*, 61: 2371-5, 2001.

SHIMA K, KOBAYASHI I, SAITO I, KIYOSHIMA T, MATSUO K, OZEKI S, OHISHI M, SAKAI M. Incidence of Human Papillomavirus 16 and 18 Infection and p53 Mutation in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma in Japan. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 38: 445-450, 2000.

SHINTANI S, MIHARA M, NAKAHARA Y, KIYOTA A, UHEYAMA Y, MATSUMURA T. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol*, 38(3): 235-243, 2002.

SIPRASHVILI Z, SOZZI G, BARNES LD, McCUE P, ROBINSON AK, ERYOMIN V, SARD L, TAGLIABUE E, GRECO A, FUSETTI L, SCHWARTZ G, PIEROTTI MA, CROCE CM, HUEBNER K. Replacement of Fhit in cancer cells suppresses tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci*, 94: 13771-76, 1997.

SMEETES DFCM, SCHERES JMJC, HUSTINX TWJ. *Human Genet*, 72: 215-220, 1986.

SMITH ML, CHEN IT, ZHAN Q, O'CONNOR PM, FORNACE AJJ. Involvement of The p53 Tumor Suppressor in Repair of UV – Type DNA Damage. *Oncogene*, 10: 1053–1059, 1995.

SMITH EM, RITCHIE JM, SUMMERSGILL KF, HOFFMAN HT, WANG DH, HAUGEN TH, TUREK LP. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*, 96(6): 449-455, 2004.

SNIJDERS PJF, STEENBERGEN RDM, MEIJER CJLM, WALBOOMERS JMM. Role of Human Papillomavirus in Cancer of the Reepiratory and Upper Digestive Tract. *Clin Dermatol*, 15: 415–425, 1997.

SOUSA FACG, BRANDÃO AAH, ALMEIDA JD, ROSA LEB. Alterações gênicas e câncer bucal – uma breve revisão. *Rev Bras de Patologia Oral*, 3(1): 20-25, 2004.

SOUTHERN SA, HERRINGTON CS. Dsructions of Cell Cycle Control by Human Papillomaviruses With Special Reference to Cervical Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*, 10: 263–274, 2000.

SOZZI G, SARD L, DE GREGÓRIO L, MARCHETTI A, MUSSO K, BUTTITTA F, TORNIELLI S, PELLEGRINI S, VERONESE ML, MANENTI G, INCARBONE M, CHELLA A, ANGELETTI CA, PASTORINO U, HUEBNER K, BEVILAQUA Q, PILOTTI S, CROCE CM, PIEROTTI MA. Association between cigarreti smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res*, 57: 2121-2123, 1997.

SUGERMAN PB, SHILLITOE EJ. The High Risk Human Papillomaviruses and Oral Cancer: Evidence for and Against a Causal Relationship. *Oral Dis*, 3:130–147, 1997.

SUGIYAMA M, BHAWAL UK, DOHMEN T, ONO S, MIYAUCHI M, ISHIKAWA T. Detection of human papillomavirus –16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic and malignant oral epithelium. *Oral and Maxillofacial Pathology*, 95(5): 594-600, 2003.

- SUNG NS, ZENG Y, RAAB-TRAUB N. Alterations on chromosome 3 in endemic and nonendemic nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 86: 244-250, 2000.
- SYRJANEN KJ, GISSMANN L, KOSS LG. Papillomaviruses and Human Disease. Heidelberg: Springer-Verlag, 104-137, 1987.
- SYRJANEN SM, SYRJANEN KJ. New Concepts on the Role of Human Papillomavirus in Cell Cycle Regulation. *Ann Med*, 31: 175–187, 1999.
- SYRJANEN SM, SYRJANEN KJ, HAPPONEN RP, LAMBERG MA. In situ DNA hybridization analysis of human papillomavirus (HPV) sequences in benign oral mucosal lesions. *Arch Dermatol Res*, 279(8): 543-549, 1987.
- TANIMOTO K, HAYASHI S, TSUCIYA E, TOKUCHI Y, KOBAYASHI Y, YOSHIGAKI, OKUI T, KOBAYASHI M, ICHIKAWA T. Abnormalities of the FHIT gene in human oral carcinogenesis. *Br J Cancer*, 82(4): 838-43, 2000.
- TAVARES MR, NOMA RK. Epidemiologia e fatores de riscos do câncer da cavidade oral. *Rev Med*, 76(5): 256- 259, 1997.
- TERAI M, BURK RD. Complete Nucleotide Sequence and Analysis of a Novel Human Papillomavirus (HPV 84) Genome Cloned by an Overlapping PCR Method. *Virology*, 279: 109–115, 2001.
- TERAI M, TAKAGI M. Human Papillomavirus in the Oral Cavity. *Oral Med Pathol*, 6: 01–12, 2001.
- TERAI M, TAKARI M, MATSUKURA T, SATA T. Oral Wart Associated With Human Papillomavirus Type 2. *J Oral Pathol Med*, 28: 137–140, 2001.
- THOMAS M, PIM D, BANKS L. The Role of the E6-p53 Interaction in the Molecular Pathogenesis of HPV. *Oncogene*, 18: 7690 –7700, 1999.
- TINOCO JA, SILVA AF, OLIVEIRA CAB, RAPOPORT A, FAVA A, SOUZA RP. Human papillomavirus (HPV) infection and its relation with squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx. *Rev Assoc Med Bras*, 50:(3), 2004.
- TODD R, DONOFF RB, WONG DT. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. *J Oral Maxillofac Surg*, 55: 613-623, 1997.
- TOMMASI AF. Diagnóstico Bucal. São Paulo: Pancas, 2002.

TOMIZAWA Y, NAKAJIMA T, KOHNO T, SAITO R, YAMAGUCHI N, YOKOTA J. Clinicopathological significance of Fhit protein expression in stage I non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res*, 58: 5478-83, 1998.

TSAI CH, YANG CC, CHOU LSS, CHOU MY. The correlation between alteration of p 16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 30: 527-31, 2001.

UICC. UNION INTERNACIONALE CONTRA LE CANCER. TNM Classificação dos tumores malignos. 6ª edição. Ana Lúcia Amaral Eisenberg. Rio de Janeiro: INCA, 2004. <http://www.inca.gov.br/tratamento.tnm.tnm2.pdf>. Acesso em 29 set 2005.

VAN DER RIET P, NAWROZ H, HRUBAN RH. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res*, 54(5): 1156-1158, 1994.

VAN HEERDEN WFP, SWART TJP, ROBSON B, SMITH TL, ENGELBRECHT S, VAN HEERDEN MB, VAN RENSBURG EJ, HUEBNER K. FHIT RNA and protein expression in oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Research*, 21: 2425-2428, 2001.

VAN HEERDEN WFP, SWART TJP, VAN HEERDEN MB, VAN RENSBURG EJ, ENGELBRECHT S, DREYER L, HUEBNER K. Immunohistochemical evaluation of FHIT protein expression in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*, 28: 433-437, 1999.

VARTANIAN A, NAROVLYANSKY A, AMCHENKOVA A, TURPAEV K, KISSELEV L. Interferons induce accumulation of diadenosine triphosphate (Ap3A) in human cultured cells. *FEBS Lett*, 381: 32-34, 1996.

VARTANIAN A, PRUDOVSKY I, SUZUKI H, DAL PRA I, KISSELEV L. Opposite effects of cell differentiation and apoptosis on Ap3A/Ap4A ratio in human cell cultures. *FEBS Lett*, 415: 160-162, 1997.

VICENTE JC, HERRERO-ZAPATERO A, FRESNO MF, LÓPEZ-ARRANZ JS. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol*, 38: 301-08, 2002.

VIDAL AKL, CALDAS JR AF, MELO RJV, BRANDÃO VRA, ROCHA GI, TAROMARU E. HPV detection in oral carcinomas. *J Bras Patol Med Lab*, 40(1): 21-26, 2004.

VIRGÍLIO L, SHUSTER M, GOLLIN SM, VERONESE ML, OHTA M, HUEBNER K, CROCE CM. FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 9770-9775, 1996.

VON KNEBEL DOEBERITZ M. New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*, 38: 2229-42, 2002.

XAVIER SD, FILHO IB, LANCELOTTI CLP. Prevalência de Achados Sugestivos de Papilomavírus Humano (HPV) em Biópsias de Carcinoma Espinocelular de Cavidade Oral e Orofaringe: Estudo Preliminar. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 71: 510–514, 2005.

WALBOOMERS JM, JACOBS MV, MANOS MM. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189: 12-19, 1999.

WERNES BA, LEVINE AJ, HOWLEY PM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 preprotein with p53. *Science*, 248: 76-79, 1990.

WHYTE DA, BROTON CE, SHILLITOE EJ. The Unexplained Survival of Cells in Oral Cancer: What is The Role of p53. *J Oral Pathol Med*, 31: 25–33, 2002.

WING YUEN P, MAN M, YIN LAM K, LAM KWONG Y. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol*, 55(1): 58-60, 2002.

WORLD HEALTH REPORT. The World Health Report 2003. Continuous improvement of oral health in the 21st century - the approach of the WHO Oral Health Programme. Geneva, Suíça. Organização Mundial de Saúde, 2003. Disponível em: [http://www.who.int/oral_health/media/en/orh_report03\)en.pdf](http://www.who.int/oral_health/media/en/orh_report03)en.pdf). Acesso em 09 fev 2007.

ZAHA A, FERREIRA HB, PASSAGLIA LMP. *Biologia Molecular Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

ZEGARELLI EV. *Diagnóstico das Doenças da Boca e dos Maxilares*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 174–315, 1982.

ZHANG L, ROSIN M, PRIDDY R, XIAO Y. p53 Expression During Multistage Human Oral Carcinogenesis. *Int J Oncol*, 3: 753–739, 1993.

ZHANG ZY, SEDK P, CAO J, CHEN WT. Human papillomavirus type 16 and 18 in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33(1): 71-74, 2004.

ZUR HAUSEN H. Papillomavirus Infections – a Major Cause of Human Cancers. *Biophysica Acta*, 1288: 55–78, 1996.

ZUR HAUSEN H. Papillomavirus causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. Journal National Cancer Institute, 92: 690-699, 2000.