



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

ISSN: 1676-2444

jbpm1@sbpc.org.br, adagmar.andriolo@gmail.com

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Silva Júnior, José de Assis; Gonçalves Bernardo, Vagner; Zavaro Balassiano, Karen; Dantas Soares, Flávia; Carvalho da Fonseca, Eliene; da Silva, Licínio Esmeraldo; de Queiroz Chaves Lourenço, Simone
Análise comparativa da imunoexpressão da proteína p53 (clones DO-7 e PAb-240) em carcinomas de células escamosas intrabuciais e labiais
Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 45, núm. 4, agosto, 2009, pp. 335-342
Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
Rio de Janeiro, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541949011>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Análise comparativa da imunoexpressão da proteína p53 (clones DO-7 e PAb-240) em carcinomas de células escamosas intrabucais e labiais

Primeira submissão em 25/04/09
Última submissão em 26/05/09
Aceito para publicação em 10/08/09
Publicado em 20/08/09

Comparative analysis of p53 protein immunostaining (antibodies DO-7 and PAb-240) in oral cavity and lip squamous cell carcinomas

José de Assis Silva Júnior¹; Vagner Gonçalves Bernardo²; Karen Zavaro Balassiano³; Flávia Dantas Soares⁴; Eliene Carvalho da Fonseca⁵; Lícínio Esmeraldo da Silva⁶; Simone de Queiroz Chaves Lourenço⁷

unitermos	resumo
<p>Carcinoma de células escamosas</p> <p>Câncer oral</p> <p>Imuno-histoquímica</p> <p>Proteína supressora de tumor p53</p>	<p>Introdução: A carcinogênese caracteriza-se como um processo multifatorial, e a inativação da proteína p53 é uma alteração genética comumente observada nos carcinomas de células escamosas de boca (CCEB). Objetivo: Analisar e comparar a imunoexpressão da proteína p53, por meio dos clones DO-7 e PAb-240, em CCEB com localização intrabucal e em lábio inferior. Material e métodos: Foram selecionados 40 casos de CCEB, sendo 20 de localização intrabucal e 20 em lábio inferior. Foi realizado um estudo imuno-histoquímico utilizando os anticorpos anti-p53 clone DO-7 e PAb-240. A imunoquantificação foi realizada por meio de análise digital de imagem, e os resultados, submetidos a tratamentos estatísticos. Resultados: A imunoexpressão da proteína p53 foi verificada com o anticorpo DO-7 em 13 casos (65%) de carcinoma intrabucal e em 19 (95%) de carcinoma de lábio inferior. Imunorreatividade para o anticorpo PAb-240 foi observada em 9 casos (45%) de lesões intrabucais e em 15 (75%) localizados em lábio inferior. Não foram observadas, segundo o teste de Mann-Whitney, diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) na expressão da proteína p53 entre as duas localizações estudadas, independentemente do anticorpo avaliado. Foram identificadas, pelo teste de Wilcoxon, diferenças estatisticamente significativas entre a expressão dos clones DO-7 e PAb-240 em cada um dos grupos analisados (valor $p = 0,013$ – lábio inferior; valor $p = 0,016$ – intrabucal). Conclusões: A expressão da proteína p53 observada nos CCEB, com localizações intrabucais e labiais, sugere a ocorrência de mutações no gene TP53. As diferenças quantitativas obtidas entre os anticorpos estudados, independentemente da localização das lesões, refletem uma especificidade distinta entre os clones DO-7 e PAb-240. O desenvolvimento de mais estudos será fundamental para estabelecer o anticorpo mais adequado para proteína p53 em CCEB.</p>

abstract	key words
<p>Background: Carcinogenesis is a multifactorial process and inactivation of p53 protein is a genetic change commonly observed in oral squamous cell carcinomas (OSCC). Objectives: To analyze and compare the expression of p53 protein through antibodies DO-7 and PAb-240 in OSCC samples located in the oral cavity and lower lip. Material and methods: Forty cases of OSCC were selected and divided into oral cavity and lower lip groups (20 cases each). Immunohistochemical technique was performed using antibodies DO-7 and PAb-240. Quantification of the cases was performed through digital image analysis and underwent specific statistical treatments. Results: Expression of p53 protein was verified with DO-7 antibody in 13 cases (65%) of oral cavity carcinomas and in 19 cases (95%) of lower lip carcinoma. PAb-240 positivity was detected in 9 cases (45%) of oral cavity lesions and in 15 cases (75%) located in the lower lip. According to Mann-Whitney test, there were no statistically significant differences between the expressions of p53 protein in both groups, regardless of the antibody used. According to Wilcoxon test, there were statistically significant differences between the expression of DO-7 antibody and PAb-240 in each of the analyzed groups ($p\text{-value} = 0.013$; lower lip $p\text{-value} = 0.016$ - oral cavity). Conclusions: The expression of p53 protein was observed both in the oral cavity and lip OSCC, which suggests the occurrence of mutations in TP53 gene. The quantitative differences between the antibodies studied, regardless of the site of the lesions, reflect different specificity between clones DO-7 and PAb-240. Further studies are required to establish the best antibody for p53 protein in oral squamous cell carcinomas.</p>	<p>Squamous cell carcinoma</p> <p>Oral cancer</p> <p>Immunohistochemistry</p> <p>Tumor suppressor protein p53</p>

1. Mestre em Patologia pela Universidade Federal Fluminense (UFF).

2. Mestre em Patologia pela UFF.

3. Doutora em Patologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB/USP).

4. Mestre em Patologia pela UFF.

5. Mestre em Biologia Celular e Molecular pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC); professora adjunta do Departamento de Patologia da UFF.

6. Mestre em Sistema de Gestão pela UFF; professor adjunto do Departamento de Estatística da UFF.

7. Doutora em Patologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru (FOB/USP);

professora adjunta do Departamento de Patologia da UFF.

Introdução

O câncer de boca representa cerca de 3% de todas as neoplasias malignas nos homens e 2% nas mulheres, segundo a Sociedade Americana de Câncer (SAC)⁽³⁰⁾. No Brasil, está entre os dez tipos de câncer mais frequentes, constituindo-se em um problema de saúde pública. A estimativa de incidência desse tipo de câncer para 2008 aponta esse tumor como o sexto mais comum entre os homens (com 10.380 casos estimados) e o sétimo entre as mulheres (com 3.780 casos estimados)⁽²²⁾.

O carcinoma de células escamosas (CCE) compreende cerca de 90% de todas as neoplasias malignas da boca, sendo a língua, o lábio inferior e o assoalho bucal os sítios frequentemente afetados^(10, 20, 30). O local de acometimento desses tumores deve ser considerado um importante indicador de prognóstico, uma vez que os localizados em lábio inferior exibem melhores prognósticos, quando comparado com as demais localizações intrabucais^(2, 9). Tal fato pode estar associado à exposição a fatores etiológicos distintos; os localizados em lábio estão estritamente relacionados com os níveis de exposição à radiação ultravioleta, enquanto aqueles localizados em regiões intrabucais estão frequentemente associados ao tabagismo e ao etilismo^(29, 30, 32).

O gene supressor de tumor *TP53*, descrito primeiramente em 1979^(7, 24, 25), codifica a proteína p53, que age como fator de transcrição com importantes funções na regulação do ciclo celular e indução da apoptose, em decorrência a danos no DNA^(4, 31, 46). Em tecidos normais, a proteína selvagem está expressa em baixas concentrações, fato que pode ser justificado pela sua meia-vida curta, sendo sua presença raramente detectada pela técnica de imuno-histoquímica^(17, 31).

Mutações no gene *TP53* são alterações moleculares comuns nos CCE^(17, 31, 47); no entanto, estudos têm demonstrado um padrão de mutação distinto associado a fatores etiológicos específicos^(32, 35). Consequentemente, a localização do câncer de boca pode determinar diferentes padrões de mutação, como o encontrado nos CCE de lábio e intrabucal⁽³²⁾. Normalmente, essas mutações estão localizadas em domínios específicos da proteína p53⁽³⁷⁾, ocorrendo com maior frequência no domínio hidrofóbico de ligação ao DNA^(8, 43). Apenas 5% das mutações acometem as regiões N-terminal e C-terminal e, quando ocorrem, podem não alterar a conformação da proteína^(8, 14).

Diferentes anticorpos monoclonais estão disponíveis para avaliação da expressão da proteína p53 na espécie humana,

representados por clones específicos que reconhecem diferentes epítomos localizados entre as quatro regiões funcionais principais da proteína p53^(3, 16, 27, 45), sendo a maioria dos anticorpos direcionada a epítomos situados na região N-terminal da proteína. Para investigar sua estrutura funcional, assim como estabelecer comparações entre a proteína selvagem e a mutante⁽⁴⁸⁾, a escolha correta do anticorpo pode definir a expressão da proteína nos tecidos, assegurando a sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados⁽⁴²⁾.

Clones como o DO-7 são capazes de se ligarem na conformação nativa e mutada da proteína, enquanto outros, como o PAb-240, reagem somente com a proteína p53 mutante. O anticorpo PAb-240 apresenta especificidade na identificação de uma sequência específica localizada na região de ligação do DNA⁽⁴⁰⁾, frequentemente alterada nas neoplasias malignas^(8, 43), incluindo as que acometem a boca^(11, 17, 47).

Considerando que a maioria das investigações utiliza o anticorpo clone DO-7, em que a imunopositividade pode refletir um aumento da expressão da proteína p53 nativa e/ou mutada e que outras sequências da estrutura proteica são mais associadas à presença de mutações nas neoplasias malignas (como a identificada pelo clone PAb-240), justifica-se a realização de mais estudos. Este trabalho teve como objetivo analisar e comparar a imunexpressão da proteína p53, por meio dos clones DO-7 e PAb-240, em carcinomas de células escamosas de boca (CCEB), com localização intrabucal e em lábio inferior.

Material e métodos

Amostra

Foram selecionados 40 casos de CCEB, provenientes de biópsias incisionais, diagnosticados no arquivo do Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Universitário Antônio Pedro da Universidade Federal Fluminense (HUAP/UFF). A amostra foi dividida em dois grupos de acordo com a localização: intrabucal (grupo I) e em lábio inferior (grupo II). A partir dos laudos histopatológicos, foram coletados os seguintes dados clínicos: sexo, idade e localização anatômica. O critério de seleção da amostra foi de material exibindo histopatologia característica, livre de artefatos, bem preservado e com quantidade suficiente para realização de recortes. As amostras coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE) foram

avaliadas segundo o grau de diferenciação determinado pela Organização Mundial da Saúde (OMS)⁽¹⁾.

Técnica de imuno-histoquímica

A técnica imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Imuno-histoquímica do SAP-HUAP/UFF para detecção da proteína p53, utilizando os anticorpos monoclonais obtidos de camundongo anti-p53 clone DO-7 (DAKO Cytomation – EUA, classe IgG2b, 1:200, código M7001) e anti-p53 clone PAb-240 (DAKO Cytomation – EUA, classe IgG1, 1:300, código M3566), por meio da técnica da estreptavidina-biotina-imunoperoxidase. Para cada bloco, foram realizados cortes histológicos seriados de 4 µm de espessura, estendidos em lâminas previamente tratadas com substância adesiva (3-aminopropil-trietoxi silano, SIGMA – USA). Os cortes obtidos foram desparafinizados em xilol e reidratados em soluções de álcool etílico.

O bloqueio da peroxidase endógena foi obtido por meio da imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio (P.A.) a 3% diluído em água destilada durante 30 minutos. Para a recuperação antigênica em banho-maria, utilizou-se a solução comercial da DAKO de pH 6 (Target antigen retrieval solution 10X concentrate, código S1699 DAKO Cytomation – EUA) para o anticorpo anti-p53 clone DO-7 e solução comercial da DAKO de pH 9,9 (Target antigen retrieval solution High pH 10X concentrate, código S3307 DAKO Cytomation – EUA) para o anticorpo monoclonal anti-p53 clone PAb-240. Esse protocolo foi estabelecido após inúmeros testes realizados previamente.

Posteriormente, as secções foram incubadas com anticorpo primário em *overnight* a 4°C. Finalizado o tempo de incubação com os anticorpos primários, os cortes foram imersos em solução tampão TBS-T (800 ml de ácido clorídrico 1N; 116 g de NaCl; 122 g de hidroxil-metil-amino-metano, 10 ml de Tween 20; completando para 20 l de água destilada; 0,05M/pH 7,4) e submetidos à incubação com o complexo estreptavidina-biotina (LSAB + System, HRP, código K0690, DAKO Cytomation – EUA). O anticorpo secundário biotilado foi aplicado sobre os cortes, permanecendo por 30 minutos em câmara umidificadora à temperatura ambiente, seguido por dois banhos em solução tampão TBS-T, cada um por cinco minutos. Em sequência, aplicou-se a estreptavidina sobre os cortes, aguardando-se mais 30 minutos nas mesmas condições. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em solução tampão TBS-T e reveladas com o substrato cromógeno diaminobenzidina (Liquid DAB + substrate, Chromogen System, código

K3468, DAKO Cytomation – EUA). Após essa etapa, as lâminas foram lavadas com água destilada e contracordadas com hematoxilina de Harris. Cortes de um caso de CCEB previamente positivo para os anticorpos empregados foram utilizados como controle positivo. O controle negativo foi obtido pela substituição do anticorpo primário pela mesma solução usada para diluir os anticorpos (Antibody Diluent with background Reducing components, código S3022 DAKO Cytomation – EUA), conforme procedimento imuno-histoquímico usual do referido laboratório.

Análise quantitativa

A quantificação da marcação obtida pela técnica de imuno-histoquímica foi realizada por meio de análise digital de imagem, usando a mesma metodologia empregada no trabalho de Camisasca *et al.*⁽⁵⁾, com o auxílio do Programa Image ProPlus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). De cada caso, um total de cinco campos foi capturado, selecionando-se áreas de maior imunopositividade e utilizando-se a objetiva de 20x. O índice de área foi determinado pela razão entre a área imunopositiva quantificada e a área tumoral total previamente delimitada.

Análise estatística

Os dados dos índices de área foram descritos por meio dos parâmetros média (\pm desvio padrão) e número de casos. Comparação entre os índices de área, tanto pelo clone DO-7 quanto pelo PAb-240 nos dois grupos avaliados, foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, e a comparação entre os índices de área de cada marcador foi realizada pelo teste de Wilcoxon. O nível de significância das decisões estatísticas foi de 0,05 (5%) e a análise estatística foi apoiada pelo programa Statistical Package of Social Science (SPSS) versão 10.0.

Resultados

O perfil da amostra, de acordo com as variáveis gênero, idade, localização e gradação histopatológica, está descrito nas **Tabelas 1 e 2**.

Foi observada expressão da proteína p53 no núcleo das células epiteliais tumorais (coloração acastanhada), para os anticorpos clones DO-7 e PAb-240 (**Figuras 1 e 2**).

Perfil da amostra de indivíduos com CCE em lábio segundo parâmetros clínico-demográficos e histopatológicos

Tabela 1

Variáveis	n	%
Gênero*		
Masculino	16	84
Feminino	3	16
Idade*		
≥ 45 anos	13	68
< 45 anos	6	32
Gradação histopatológica**		
Bem diferenciado	5	25
Moderadamente diferenciado	15	75
Pouco diferenciado	-	-

* Em um caso essa informação não estava disponível nas requisições analisadas

** Segundo OMS, 2005⁽¹⁾

CCE: carcinoma de células escamosas; OMS: Organização Mundial da Saúde.

Ao analisar a amostra de acordo com a sua localização, foi observada imunopositividade em 13 casos (65%) dos carcinomas intrabuciais e em 19 casos (95%) nos carcinomas de lábio inferior com o anticorpo anti-p53 clone DO-7. Para o anticorpo anti-p53 clone PAb-240 foi observada marcação positiva em 9 casos (45%) das lesões intrabuciais e 15 casos (75%) localizados em lábio inferior (**Tabela 3**).

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), por meio do teste de Mann-Whitney, entre a expressão da proteína p53 nos casos de localização no lábio inferior e intrabucal, tanto para o clone DO-7 ($U = 173,5$; valor $p = 0,478$), quanto para o PAb-240 ($U = 144,5$; valor $p = 0,134$).

Ao comparar a expressão da proteína p53 entre os clones DO-7 e o PAb-240, o teste de Wilcoxon evidenciou

Distribuição da amostra de indivíduos com CCE intrabucal segundo parâmetros clínico-demográficos e histopatológicos

Tabela 2

Variáveis	n	%
Gênero*		
Masculino	15	83
Feminino	3	17
Idade**		
≥ 45 anos	11	73
< 45 anos	4	27
Localização intrabucal		
Língua	9	45
Palato	4	20
Assoalho	3	15
Rebordo alveolar	2	10
Mucosa jugal	1	5
Gengiva	1	5
Gradação histopatológica***		
Bem diferenciado	1	5
Moderadamente diferenciado	18	90
Pouco diferenciado	1	5

*Em dois casos essa informação não estava disponível nas requisições analisadas

**Em cinco casos essa informação não estava disponível nas requisições analisadas

***Segundo OMS, 2005⁽¹⁾

CCE: carcinoma de células escamosas; OMS: Organização Mundial da Saúde.

diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) tanto em lábio inferior ($Z = 2,495$; $p = 0,013$) quanto em localização intrabucal ($Z = 2,411$; $p = 0,016$), mostrando uma maior expressão do clone DO-7, tanto nos casos de CCE intrabucal quanto nos casos de CCE de lábio.

Expressão da proteína p53 (% de área marcada)

Tabela 3

Anticorpos/clones	Localização	
	Intrabucal	Lábio inferior
Anti-p53 DO-7	6,48% ($\pm 3,83\%$) $n = 13$	5,63 ($\pm 7,05\%$) $n = 19$
Anti-p53 PAb-240	4,03% ($\pm 3,7\%$) $n = 9$	4,02% ($\pm 4,89\%$) $n = 15$

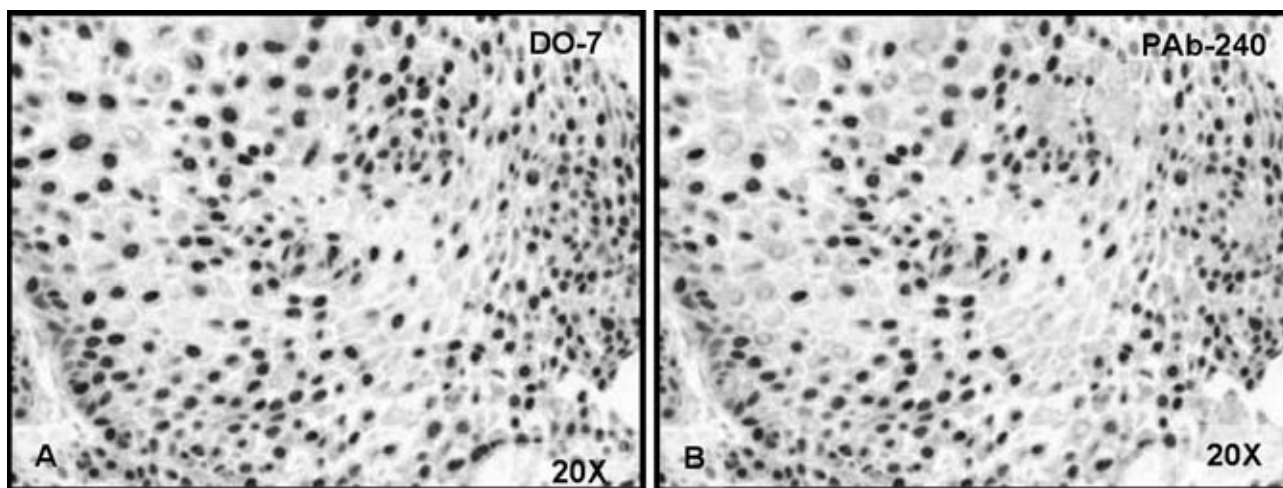


Figura 1 – Carcinomas de células escamosas com localização intrabucais. **A.** Expressão nuclear da proteína p53 por meio do anticorpo monoclonal clone DO-7. **B.** Imunoexpressão da proteína p53, exibindo marcações nucleares nas células tumorais, representada pelo clone PAb-240. (Estreptavidina-biotina-imunoperoxidase, objetiva de 20X)

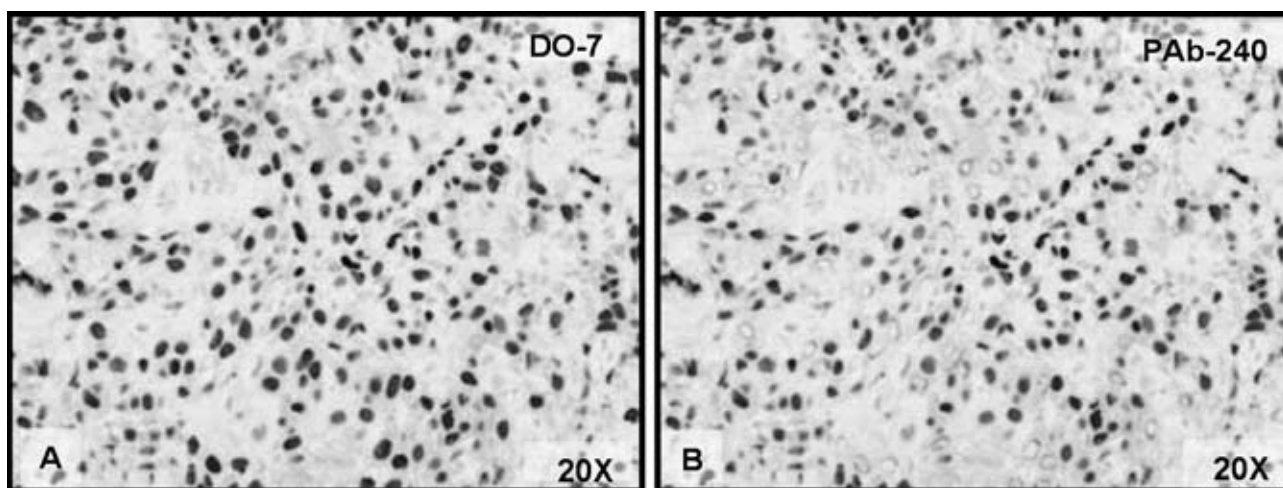


Figura 2 – Carcinomas de células escamosas localizados em lábio inferior. **A.** Expressão nuclear da proteína p53 representada pelo anticorpo monoclonal clone DO-7. **B.** Imuno-localização da proteína p53, mostrando o padrão nuclear, representada pelo clone PAb-240. (Estreptavidina-biotina-imunoperoxidase, objetiva de 20X)

Discussão

O gene *TP53* é considerado um dos principais genes associados à supressão tumoral por desempenhar importantes funções nos processos fisiológicos e patológicos^(38, 44, 46). Apresenta-se comumente mutado em diversas neoplasias malignas, incluindo as que acometem a boca^(11, 37, 47).

Diversas são as técnicas que estão disponíveis para o estudo de alterações na molécula p53, incluindo a análise de mutação desse gene, assim como a expressão da proteína⁽³¹⁾. Mutações no gene *TP53* podem alterar a função da proteína codificada, acarretando um aumento na sua meia-vida biológica (normalmente curta), podendo assim ser identificada pela técnica da imuno-histoquímica^(17, 31). Essa técnica tem grande aplicação na rotina diagnóstica e na pesquisa científica. Inúmeros estudos utilizam essa me-

todologia para avaliar a expressão da proteína p53 no CCEB em busca por biomarcadores prognósticos^(2, 6, 12, 23, 33, 34).

A técnica da imuno-histoquímica pode fornecer dados limitados quando se deseja avaliar a expressão da proteína p53 na carcinogênese bucal, apresentando uma discordância de aproximadamente 40% quando comparada à técnica de sequenciamento do DNA^(26, 41). O acúmulo dessa proteína pode ocorrer devido a outros fatores, como associação com proteínas virais, falhas na sua degradação, ou até mesmo ser identificada em sua função biológica normal, gerando resultados falso-positivos^(13, 31). Sendo assim, considerações técnicas, como escolha do anticorpo, fixação do tecido e protocolo de recuperação antigênica, podem interferir no padrão da imunopositividade, influenciando os resultados obtidos⁽²⁸⁾.

O tabaco e o álcool estão bem estabelecidos como fatores etiológicos exógenos no desenvolvimento e na

progressão dos carcinomas intrabuciais; diferentemente, os carcinomas localizados em lábio inferior recebem bastante influência da exposição à radiação solar^(29, 30, 32). Dessa forma, a amostra desse estudo foi dividida em dois grupos, de acordo com sua localização (intrabucal e lábio inferior).

No presente estudo, observou-se a expressão da proteína p53 nos carcinomas com localização em lábio inferior em 19 casos (95%) quando utilizado o clone DO-7 e em 15 casos (75%) para o PAb-240. Em um estudo conduzido por Horta *et al.*⁽²¹⁾, foi avaliada uma série de 21 carcinomas de lábio, obtendo-se expressão positiva da proteína p53, verificada pelo clone DO-1 em 85,7% dos casos avaliados. Em uma análise de 79 carcinomas de lábio, Garcia-Montesinos-Perea *et al.*⁽¹⁶⁾ verificaram imunopositividade para a proteína p53 por meio do clone DO-7 em 70,6% dos casos. Em relação aos casos com localização intrabucal, foi observado nesse estudo expressão positiva da proteína p53 em 13 casos (65%) para o anticorpo DO-7 e em 9 casos (45%), para o PAb-240. Cruz *et al.*⁽¹¹⁾, em uma análise de carcinomas intrabuciais, verificaram a expressão da proteína p53 em 33 casos (60% dos avaliados), utilizando o anticorpo DO-7. Estudos realizados por Schoelch *et al.*⁽³⁶⁾, em uma amostra de 35 casos de CCEB intrabuciais, observaram imunopositividade para p53, utilizando o anticorpo DO-7 em 18 casos (51,4%). Quando comparados aos trabalhos similares descritos na literatura, os resultados imuno-histoquímicos obtidos nesse estudo mostraram percentuais de imunopositividade semelhantes, embora haja divergências no perfil da amostras, nos protocolos imuno-histoquímicos, nos anticorpos selecionados e na forma de análise dos resultados obtidos.

A expressão da proteína p53 em ambos os clones avaliados predominou nos casos de carcinomas de lábio inferior (DO-7 – 95%, PAb-240 – 75%) em relação aos intrabuciais (DO-7 – 65%, PAb-240 – 45%), porém sem diferença estatisticamente significativa quando os índices de área foram comparados. Com objetivo de avaliar mutações no *gene TP53* em câncer de lábio e com localização intrabucal, Ostwald *et al.*⁽³²⁾ verificaram que a presença e o tipo de mutações desse gene estão associados às diferenças de localização da lesão, estando a radiação solar relacionada com um tipo específico de mutação, com padrão diferente dos CCE intrabuciais, em que se observou estreita relação com o tabaco. Dessa maneira, a localização dos tumores que afetam a boca deve ser considerada no estudo da molécula p53. Outro ponto que deve ser valorizado no desenho do estudo e que pode influenciar nos resultados são as condições sociocultural e geográfica da população em análise^(35, 38).

Embora existam diversos trabalhos na literatura que correlacionam a expressão da proteína p53 nos CCEB, a maioria utiliza o anticorpo monoclonal anti-p53 DO-7, que reconhece a proteína em sua conformação selvagem e mutada, identificando um epítipo localizado entre os aminoácidos 21 a 25⁽³⁹⁾. Neste estudo, foram incluídos os clones DO-7 e PAb-240 por reconhecerem domínios específicos e distintos da proteína p53, com a finalidade de avaliar e comparar suas expressões em CCEB. O anticorpo monoclonal PAb-240 reconhece um epítipo altamente conservado entre as espécies, localizado em humanos, entre os aminoácidos 213 a 217⁽⁴⁰⁾ com especificidade somente para a conformação mutada da proteína p53⁽¹⁵⁾.

Ao comparar a expressão da proteína utilizando-se dois marcadores direcionados a diferentes epítopos da proteína p53, foram verificadas diferenças quantitativas de marcação nos anticorpos estudados. A marcação foi mais evidente com o anticorpo DO-7 quando comparado ao PAb-240 ($p > 0,05$) independentemente do grupo de lesão, o que vai de encontro aos trabalhos de Gonzalez-Moles *et al.*,⁽¹⁸⁾ e Harlozinska *et al.*,⁽¹⁹⁾ em estudos desenvolvidos em líquen plano oral e carcinomas de ovário, respectivamente. Jayasurya *et al.*⁽²³⁾ investigaram a expressão da proteína p53 (clones DO-7 e PAb-240) em 348 tumores malignos da cavidade bucal, verificando que o anticorpo DO-7 mostrou-se mais expresso em intensidade e quantidade quando comparado ao PAb-240. Os resultados do presente estudo em associação aos estudos supracitados confirmam a identificação de sequências diferentes da proteína p53 por esses biomarcadores (clone DO-7 e PAb-240), e esse fato deve ser considerado na análise dos resultados imuno-histoquímicos. Sendo assim, a utilização de anticorpos que identificam a proteína nativa e/ou selvagem pode justificar em parte os resultados conflitantes na análise da imunexpressão da proteína p53 nos CCEB, comumente observados nos estudos investigados.

Os avanços das técnicas de biologia molecular e a possibilidade de identificação de mutações no *gene TP53* impulsionaram estudos com o objetivo de melhor compreender a participação desse gene no desenvolvimento e na progressão dos CCEB. Contudo, como a maioria das mutações encontrada no *gene TP53* são mutações do tipo missense⁽³⁷⁾, que ocasionam acúmulo da proteína alterada no núcleo das células, acredita-se que a expressão observada pela imuno-histoquímica seja reflexo das alterações nesse gene. Nesse sentido, o estudo de técnicas de análise de mutação no *gene TP53* é necessário para confirmação de resultados obtidos com a técnica imuno-histoquímica, podendo assim

determinar os melhores anticorpos a serem empregados e estimar o papel desse biomarcador no CCEB.

Conclusões

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, foi possível observar que a expressão da proteína p53 é um

evento comumente observado nos CCEB, tanto em localização intrabucal quanto labial, sugerindo a ocorrência de mutações no *gene TP53*. As diferenças quantitativas obtidas entre os anticorpos estudados, independentemente da localização das lesões, refletem uma especificidade distinta entre os clones DO-7 e PAb-240 em CCEB. O desenvolvimento de mais estudos será fundamental para estabelecer o anticorpo mais adequado para avaliação da proteína p53 em CCEB.

Referências

1. BARNES, L. *et al.* World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press, 2005.
2. BELTRAMI, C.A.; DESINAN, L.; RUBINI, C. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. A retrospective study of 80 cases. *Pathol Res Pract*, v. 188, n. 4-5, p. 510-6, 1992.
3. BONSING, B.A. *et al.* Specificity of seven monoclonal antibodies against p53 evaluated with Western blotting, immunohistochemistry, confocal laser scanning microscopy, and flow cytometry. *Cytometry*, v. 28, n. 1, p. 11-24, 1997.
4. BOURDON, J.C. p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer*, v. 97, n. 3, p. 277-82, 2007.
5. CAMISASCA, D.R. *et al.* Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.021, 2008(in pres.).
6. CASADO, S. *et al.* Predictive value of P53, BCL-2, and BAX in advanced head and neck carcinoma. *Am J Clin Oncol*, v. 25, n. 6, p. 588-90, 2002.
7. CHANG, C. *et al.* Identification and partial characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cell. *J Virol*, v. 31, n. 2, p. 463-71, 1979.
8. CHO, Y. *et al.* Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, v. 265, n. 5170, p. 334-5, 1994.
9. COSTA, A.L.L. *et al.* Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermóide oral. *Pesqui Odontol Bras*, v. 16, n. 3, p. 216-20, 2002.
10. COSTA, A.L.L., ARAÚJO JÚNIOR, R.F.; RAMOS, C.C.F. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermóide oral. *Rev Bras Otorrinolaringol*, v. 71, n. 2, p. 181-7, 2005.
11. CRUZ, I. *et al.* Specific p53 immunostaining patterns are associated with smoking habits in patients with oral squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol*, v. 55, n. 11, p. 834-40, 2002.
12. FAN, G.K. *et al.* Immunohistochemical analysis of P57 (kip2), p53 and hsp60 expressions in premalignant and malignant oral tissues. *Oral Oncol*, v. 42, n. 2, p. 147-53, 2006.
13. FENOGLIO-PREISER, C.M. *et al.* TP53 and gastric carcinoma: a review. *Hum Mutat*, v. 21, n. 3, p. 258-70, 2003.
14. FRIEND, S. p53: A glimpse at the puppet behind shadow play. *Science*, v. 265, n. 5170, p.334-5, 1994.
15. GANNON, J.V. *et al.* Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J*, v. 9, n. 5, p. 1595-602, 1990.
16. GARCÍA-MONTESINO-PEREA, B.; VAL-BERNAL J.F.; SAIZ-BUSTILLO, R. Epidermoid carcinoma of the lip: an immunohistochemical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 10, n. 5, p. 454-61, 2005.
17. GASCO, M.; CROOK, T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol*, v. 39, n. 3, p. 222-31, 2003.
18. GONZALEZ-MOLES, M.A. *et al.* Differences in the expression of p53 protein in oral lichen planus based on the use of monoclonal antibodies DO-7 and PAb-240. *Oral Oncol*, v. 44, n. 5, p. 496-503, 2008.
19. HARLOZINSKA, A. *et al.* Relations between immunologically different p53 forms, p21(WAF1) and PCNA expression in ovarian carcinomas. *Oncol Rep*, v. 9, n. 6, p. 1173-79, 2002.
20. HIROTA, S.K. *et al.* Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: A comparative analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 13, n. 4, p. 227-31, 2008.
21. HORTA, M.C. *et al.* p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, v. 36, n. 2, p. 88-92, 2007.
22. INCA. Estimativa 2008 Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: www.inca.gov.br/estimativa/2008. Acesso em: 20 abr. 2008.
23. JAYASURYA, R. *et al.* Phenotypic alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. *Mod Pathol*, v.18, n. 8, p. 1056-66, 2005.

24. LANE, D.P.; CRAWFORD, L.V. T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, v. 278, n. 5701, p. 261-3, 1979.
25. LINZER, D. I.; LEVINE, A. J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, v. 17, n. 1, p. 43-52, 1979.
26. MA, L. *et al.* Clinical implication of screening p53 gene mutations in head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol*, v. 124, n. 7, p. 389-96, 1998.
27. MIDGLEY, C.A. *et al.* Analysis of p53 expression in human tumours: an antibody raised against human p53 expressed in Escherichia coli. *J Cell Sci*, v. 101 (Pt 1), p. 183-9, 1992.
28. MIGHELL, A. PCNA and p53. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, v. 31B, n. 6, p. 403-4, 1995.
29. MOORE, S. *et al.* The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis*, v. 5, n. 3, p. 185-95, 1999.
30. NEVILLE, B.W.; DAY, T.A. Oral cancer and precancerous lesions. *CA J Clin*, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.
31. NYLANDER, K.; DABELSTEEN, E.; HALL, P.A. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med*, v. 29, n. 9, p. 413-25, 2000.
32. OSTWALD, C. *et al.* p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. *Int J Cancer*, v. 88, n. 1, p. 82-86, 2000.
33. PARTRIDGE, M. *et al.* New insights into p53 protein stabilization in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, v. 35, n. 1, p. 45-55, 1999.
34. SARANATH, D. *et al.* p53 inactivation in chewing tobacco-induced oral cancers and leukoplakias from India. *Oral Oncol*, v. 35, n. 3, p. 242-50, 1999.
35. SATHYAN, K.M. *et al.* Carcinoma of tongue and the buccal mucosa represent different biological subentities of the oral carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, v. 132, n. 9, p. 601-9, 2006.
36. SCHOELCH, M.L. *et al.* Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, v. 35, n. 1, p. 77-85, 1999.
37. SOUSSI, T. Focus on the p53 gene and cancer: advances in TP53 mutation research. *Hum Mutat*, v. 21, n. 3, p. 173-5, 2003.
38. SOUSSI, T. *et al.* Locus-specific mutation databases: pitfalls and good practice based on the p53 experience. *Nat Rev Cancer*, v. 6, n. 1, p. 83-90, 2006.
39. STEPHEN, C.W.; HELMINEN, P.; LANE, D.P. Characterisation of epitopes on human p53 using phage-displayed peptide libraries: Insights into antibody peptide interactions. *J Mol Biol*, v. 48, n. 1, p. 58-78, 1995.
40. STEPHEN, C.W.; LANE, D.P. Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. *J Mol Biol*, v. 225, n. 3, p. 577-83, 1992.
41. TAYLOR, D. *et al.* Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. *Hum Pathol*, v. 30, n. 10, p. 1221-5, 1999.
42. THOMAS, M.D. *et al.* A novel quantitative immunoassay system for p53 using antibodies selected for optimum designation of p53 status. *J Clin Pathol*, v. 50, n. 2, p. 143-7, 1997.
43. VARLEY, J.M. Germline TP53 Mutations and Li-Fraumeni Syndrome. *Hum Mutat*, v. 21, n. 3, p. 313-20, 2003.
44. VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, v. 10, n. 8, p. 789-99, 2004.
45. VOJTĚSEK, B. *et al.* An immunochemical analysis of the human nuclear phosphoprotein p53. New monoclonal antibodies and epitope mapping using recombinant p53. *J Immunol Methods*, v. 151, n. 1-2, p. 237-44, 1992.
46. VOUSDEN, K.H.; LANE, D.P. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 8, n. 4, p. 275-83, 2007.
47. YAMAZAKI, Y. *et al.* Specific p53 mutations predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, v. 39, n. 2, p. 163-9, 2003.
48. YOLCU, E. *et al.* A monoclonal antibody against DNA binding helix of p53 protein. *Oncogene*, v. 20, n. 11, p. 1398-401, 2001.

Endereço para correspondência

Professora Simone de Queiroz Chaves Lourenço
Departamento de Patologia – Hospital Universitário Antônio Pedro
Rua Marquês de Paraná, 303 – 4º andar
CEP: 24033-900 – Niterói-RJ
e-mail: mptsl@vm.uff.br/silourenco@br.inter.net