

# Expressão imunoistoquímica da ciclina D1 e do p16 em carcinoma epidermóide de boca: correlação com sistema TNM e localização

## *Cyclin D1 and p16 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: correlation with TMN classification and location*

Eliete Neves da Silva Guerra<sup>1</sup>, Élbio C. Paula<sup>2</sup>, José Carlos de Oliveira<sup>2</sup>, Décio S. Pinto Júnior<sup>3</sup>, Vera C. Araújo<sup>3</sup>, Ney S. Araújo<sup>3</sup>

### Resumo

**Objetivo:** Avaliar a expressão imunoistoquímica da ciclina D1 e do p16 (proteínas envolvidas nas vias de proliferação celular e utilizadas para determinar o prognóstico de neoplasias malignas) em carcinoma epidermóide de boca. Correlacionar a imunomarcagem com o sistema TNM (Tamanho do tumor, presença de linfonodo metastático e metástase à distância) e com sua localização anatômica. **Métodos:** Trinta e quatro (34) blocos de parafina contendo fragmentos de biópsia incisional de carcinomas epidermóides bucais primários foram obtidos no Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás. Os dados dos pacientes quanto à localização anatômica e o Sistema TNM foram coletados dos prontuários. A expressão das proteínas ciclina D1 e p16 foi verificada através da técnica imunoistoquímica utilizando a Streptoavidina-Biotina no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). **Resultados e Conclusões:** Os resultados não revelaram diferença estatisticamente significativa entre o número médio de núcleos positivos para a ciclina D1 e os dados clínicos dos pacientes. Porém, uma menor porcentagem de marcação nos carcinomas de lábio inferior e menor expressão nos tumores classificados clinicamente como T1 foi encontrada. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número médio de núcleos p16 positivos e os dados clínicos dos pacientes com carcinoma epidermóide de boca. Pode-se sugerir que houve um acúmulo nuclear de p16, mas este resultado não tem significância no prognóstico. Entretanto, os resultados da ciclina D1 não mostraram que ela é um marcador absoluto de prognóstico, mas sugerem que o aumento do nível de ciclina D1 contribui junto com outros oncogenes no processo de progressão tumoral.

**Palavras-chave:** Carcinoma Epidermóide; Boca; Imunoistoquímica; Ciclina D1; p16.

<sup>1</sup> Professora Doutora do Departamento de Odontologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UNB), DF, Brasil

<sup>2</sup> Médicos Oncologistas do Hospital Araújo Jorge, ACCG, Goiânia, GO, Brasil

<sup>3</sup> Professores doutores de Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil

Endereço para correspondência: Profa Dra Eliete Neves da Silva Guerra - SQN, 205, bloco H apto 201, Asa Norte, Brasília, DF - CEP: 70.843-080.

E-mail: elieteneves@terra.com.br

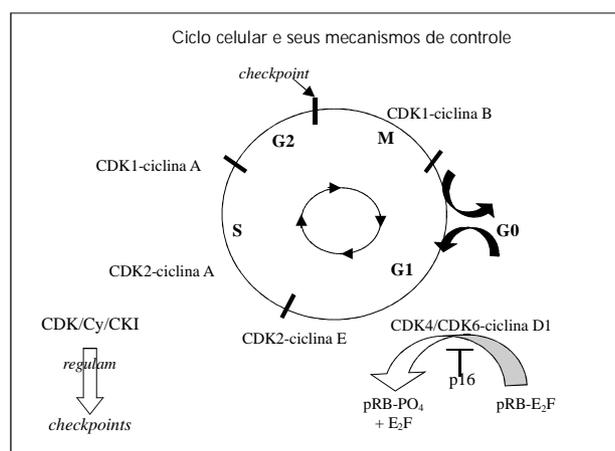
## Abstract

**Objective:** To correlate the expression of cyclin D1, an oncogene, and p16, a tumor suppressor gene to the clinicopathological features of oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods:** Formalin-fixed and paraffin-embedded samples from 34 patients with primary oral squamous cell carcinoma (OSCC) were retrieved from the files of the Araújo Jorge Hospital from Goiânia, Brazil. Features such as TMN classification and anatomical site, were obtained from the patients' records. The immunohistochemistry technique was realized in the Oral Pathology Department, School of Dentistry, University of São Paulo, Brazil. **Results and Conclusions:** There was no correlation in the mean number of cyclin D1 positive nuclei and p16 with the clinicopathological features. Therefore, cyclin D1 was less expressed in OSCC of lower lips, and in T1 tumors. The results indicated that nuclear accumulation of p16 was not found to be of prognostic significance. The findings of cyclin D1 expression doesn't show an absolute prognostic marker that is also evidence from the p values. However, they suggest that higher level of cyclin D1 expression contributes, together with other activated oncogene, in the process of tumor progression.

**Key words:** Squamous cell carcinoma; Mouth; Immunohistochemical; Cyclin D1; p16.

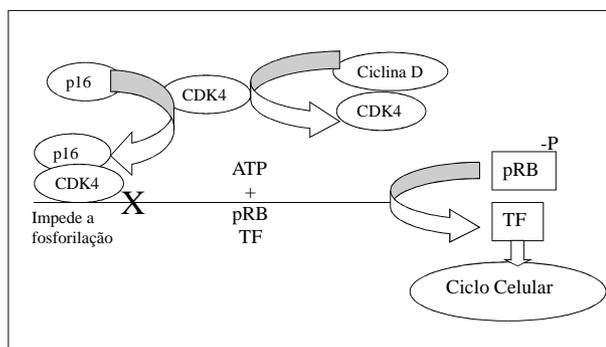
## INTRODUÇÃO

O estudo do ciclo celular relacionado ao câncer tem despertado o interesse de numerosos pesquisadores<sup>1-7</sup> em todo o mundo, culminando na conquista do prêmio Nobel de Medicina em 2001. O fato chama a atenção, pois no processo de proliferação celular estão envolvidas proteínas e produtos dos oncogenes e genes supressores de tumor que podem explicar a origem do câncer<sup>8</sup>. Diversos reguladores do ciclo celular são relatados (Figura 1), entretanto as pesquisas têm se concentrado no estudo das proteínas quinases, conhecidas como quinases dependentes de ciclina (CDKs), em seus ligantes como exemplo o p16 e nos complexos por elas formados, como o complexo ciclina D1-CDK<sup>9</sup>.



**Figura 1** - Representação esquemática do ciclo celular. Em cada ciclo os cromossomos são replicados (fase S ou síntese do DNA) e segregados para criarem duas células filhas idênticas (fase M ou mitose). Estes eventos são espaçados por intervalos de crescimento e reorganização (fases G1 e G2). A células podem sair do ciclo após a divisão e entrar em estado de quiescência (G0). O ciclo celular é regulado por numerosos complexos CDK-ciclina, como indicado acima e descrito no texto (Adaptado de COLLINS et al.<sup>1</sup>, 1997)

A progressão do ciclo celular é dependente da ação dos complexos Ciclinas-CDKs. A inibição deste processo é realizada por um grupo de proteínas que agem modulando a ação desse complexo chamado Proteínas Inibitórias dos Complexos Ciclinas-CDKs (CKIs)<sup>10</sup>. Dentre elas destaca-se a proteína p16 (Figura 2)<sup>10</sup>. A perda funcional do gene da p16 pode estar associada ao desenvolvimento e progressão de uma variedade de neoplasias malignas<sup>11</sup>.



**Figura 2** - Papel do p16 e da CDK4 na regulação do ciclo celular. A proteína p16 se liga a CDK4 e forma o complexo p16-CDK4, impedindo a fosforilação do pRB. O pRB, hipofosforilado, mantém-se supressor de tumor. Por outro lado, no caso de disfunção do p16, a CDK4 pode ligar-se à ciclina D e formar o complexo CDK4-ciclina D. Este complexo promove a fosforilação do pRB e libera o fator de transcrição (TF), o qual acelera o ciclo celular (Adaptado de CHEN et al.<sup>10</sup>, 1999).

O objetivo central deste trabalho concentrou-se na verificação da presença da ciclina D1 e do p16 através da técnica da imunistoquímica e correlacioná-las com o sistema TNM e a localização anatômica dos carcinomas epidermóides de boca. O objetivo se completa com o desejo futuro de utilizar estes resultados na clínica oncológica, determinando o prognóstico dos carcinomas

de boca. Assim, quem sabe, poderemos oferecer aos pacientes maior acurácia propedêutica, melhor eficácia terapêutica e, acima de tudo, expectativas prognósticas mais realistas.

A importância do estudo de fatores de prognóstico reside no fato de se estabelecer o comportamento biológico de uma lesão, cancerizável ou neoplásica, e aplicar este conhecimento para tentar impedir a franca malignidade ou a progressão neoplásica. O critério microscópico tem sido usado, há muito, como indicador de prognóstico. Porém, cabem algumas ressalvas: o grau de diferenciação pode variar em diferentes sítios da neoplasia, o fragmento de biópsia pode não ser representativo, além da subjetividade inerente ao observador. Outro fator de prognóstico utilizado é a classificação clínica TNM. Contudo neoplasias com mesmo estadiamento podem revelar diferentes padrões de crescimento e prognóstico<sup>12</sup>.

## MÉTODOS

Trinta e quatro (34) blocos de parafina contendo fragmentos de biópsia incisional de carcinomas epidermóides bucais primários foram obtidos no Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, com aprovação do comitê de Ética em Pesquisa dessa Associação. Os dados dos pacientes quanto à localização anatômica e o Sistema TNM foram coletados dos prontuários. A localização anatômica foi dividida em 3 grupos: língua (17 casos), lábio (7 casos) e outras (10 casos), sendo consideradas outras a região retromolar, a mucosa jugal, o assoalho bucal e a gengiva. Com relação ao Sistema TNM, 5 carcinomas foram classificados como T1, 9 como T2, 9 como T3 e 11 como T4. Onze pacientes apresentavam linfonodo regional metastático e nenhum paciente possuía metástase à distância.

A expressão das proteínas ciclina D1 e p16 foi verificada através da técnica imunistoquímica, utilizando a Streptoavidina-Biotina no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). De cada bloco de parafina contendo o material de biópsia, foram obtidos cortes de 3mm. Os espécimes foram desparafinizados com xilol e re-hidratados em concentrações graduais de álcool. Os fragmentos foram tratados em ácido cítrico pH 6,0, aquecidos a 95° C por 30 min. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com água oxigenada e metanol por 15 minutos.

Os anticorpos utilizados neste estudo foram a ciclina

D1 (clone DCS-6, Dako Corporation, Glostrup, Denmark) diluída 1:150µg/mL e p16 (clone 16P04, Neomarkers, Inc. Lab Vision Corporation, Fremont, CA, USA) diluído em 1:75µg/mL. Como soro secundário e complexo terciário utilizou-se o Kit LSAB Peroxidase (Dako corporation). Na reação de revelação os cortes foram incubados com diaminobenzidina (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e contracoloradas com hematoxilina de Mayer. Estes procedimentos foram realizados na máquina de imunistoquímica (Austainer, Dako). Posteriormente realizou-se a desidratação (cadeias ascendentes de etanóis), diafanização (3 banhos de xilol) e a montagem das lâminas (com resina Permout - Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Os controles positivos para a ciclina D1 e para o p16 foram carcinomas epidermóides que apresentavam uma marcação forte e abundante para essas proteínas. Os controles negativos foram os mesmos casos usados como controle positivo, que foram submetidos à reação imunistoquímica descrita acima com exceção da incubação com o anticorpo primário.

A análise quantitativa das células positivas para a ciclina D1 e para a p16 foi realizada a partir da contagem dos núcleos positivos das células, de coloração acastanhada.

As imagens de cada campo foram obtidas em microscópio de luz com aumento de 400x, sob um foco fixo com clareza de campo. Em seguida, foram transferidas para um monitor de TV acoplado a um sistema computadorizado, no qual realizou-se a contagem manual dos núcleos que expressaram a ciclina D1 e a p16 separadamente, após sua individualização pelo *software* Imagelab-Softium (desenvolvido no Laboratório de Informática Dedicado à Odontologia - LIDO - do Departamento de Estomatologia da FOUSP).

A contagem manual da ciclina D1 e do p16 foi realizada a partir da contagem de números de núcleos positivos em aproximadamente mil células contadas e os campos selecionados para a contagem foram escolhidos aleatoriamente.

Os dados obtidos a partir da expressão imunistoquímica da ciclina D1 e do p16 foram submetidos a análises estatísticas, para tal foi usado o programa de estatística *SPSS for Windows* versão 10.0. Foi utilizado o Teste t de *Student* para comparação das médias da ciclina D1 e do p16 tendo como variáveis independentes a localização e o Sistema TNM. Para todos os testes o erro  $\alpha$  foi estabelecido como 5%, isto é, os testes foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Os resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre as médias de marcação da ciclina D1 quando comparadas com o Sistema TNM e com a localização (Tabela 1).

A expressão da ciclina D1 nos carcinomas classificados como T1 apresentou marcação de 23,8%, sendo menor que nos carcinomas classificados como T2, T3 e T4 que mostraram, respectivamente 41,2%, 40,7% e 42,7% de marcação. Observou-se uma porcentagem de marcação aproximadamente igual para o T2, T3 e T4, sendo menor para o T1, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre estas variáveis ( $p=0,11$ ) (Tabela 1).

Com relação ao acometimento dos linfonodos regionais (N), a média de marcação da ciclina D1 foi de 45,6% nos carcinomas de pacientes com linfonodos regionais positivos (com metástase) e de 35,9% para os pacientes com linfonodos negativos (sem metástase) ( $p=0,22$ ) (Tabela 1).

Analisando a localização, verifica-se que a porcentagem de marcação da ciclina D1 no lábio inferior com 25,8% foi relativamente mais baixa que na língua com 41,2% de células marcadas e nas outras regiões com 45,4%. Observa-se, então, uma tendência em ser estatisticamente significativo ( $p=0,09$ ) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Expressão imunoistoquímica da ciclina D1 em carcinomas epidermóides bucais: correlação com sistema TNM e localização.

| Variável       | Total (N=34) | % de núcleos ciclina D1 positivos | Valor de P |
|----------------|--------------|-----------------------------------|------------|
| Sistema TNM    |              |                                   |            |
| T              |              |                                   | 0,11       |
| T1             | 5            | 23,8%                             |            |
| T2             | 9            | 41,2%                             |            |
| T3             | 9            | 40,7%                             |            |
| T4             | 11           | 42,7%                             |            |
| N              |              |                                   | 0,22       |
| N(+)           | 11           | 45,6%                             |            |
| N(-)           | 23           | 35,9%                             |            |
| Localização    |              |                                   |            |
| Lábio inferior | 7            | 25,8%                             | 0,09       |
| Língua         | 17           | 41,2%                             |            |
| Outras         | 10           | 45,4%                             |            |

A análise estatística dos resultados não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre as médias de marcação do p16 quando comparadas com o sistema

TNM e com a localização anatômica (Tabela 2). Os carcinomas classificados como T1, T2, T3 e T4 apresentam porcentagens de marcação para o p16 aproximadamente iguais, sendo respectivamente 32,4%, 28,1%, 29,9% e 28,5%. A média de marcação do p16 em relação à presença de metástase em linfonodos regionais foi de 27,5% nos positivos (com metástase) e de 30,2% nos negativos (sem metástase) (Tabela 2). Quanto à localização do carcinoma observou-se 22,3% de marcação em lábio inferior, 30,4% na língua e 33,0% nas outras regiões intrabucais ( $p=0,34$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Expressão imunoistoquímica do p16 em carcinomas epidermóides bucais: correlação com sistema TNM e localização.

| Variável       | Total (N=34) | % de núcleos p16 positivos | Valor de P |
|----------------|--------------|----------------------------|------------|
| Sistema TNM    |              |                            |            |
| T              |              |                            | 0,73       |
| T1             | 5            | 32,4%                      |            |
| T2             | 9            | 28,1%                      |            |
| T3             | 9            | 29,9%                      |            |
| T4             | 11           | 28,5%                      |            |
| N              |              |                            | 0,92       |
| N(+)           | 11           | 27,5%                      |            |
| N(-)           | 23           | 30,2%                      |            |
| Localização    |              |                            |            |
| Lábio inferior | 7            | 22,3%                      | 0,34       |
| Língua         | 17           | 30,4%                      |            |
| Outras         | 10           | 33,0%                      |            |

## DISCUSSÃO

A ciclina D1 exerce importante papel na proliferação celular, regulando a passagem da fase G1 para a fase S sendo sua superexpressão encontrada nas situações de amplificação gênica. Os dados sugerem também que o aumento dessa proteína guarda relação inversa com o prognóstico dos carcinomas epidermóides da região de cabeça e pescoço<sup>13</sup>.

Uma possível relação entre a expressão da ciclina D1 e o aspecto clínico dos pacientes com carcinomas epidermóides da região de cabeça e pescoço tem sido amplamente abordada na literatura, visando sua utilização como um possível marcador biológico de prognóstico<sup>14-20</sup>.

Analisando os resultados da Tabela 1 verifica-se que a porcentagem de células marcadas nos carcinomas de lábio inferior (25,8%) foi menor que a dos carcinomas localizados na língua (41,2%) e nas outras regiões intrabucais (45,4%). Os trabalhos da literatura não

revelaram diferença significativa entre a expressão da ciclina D1 e a localização dos carcinomas epidermóides bucais. Porém, LAM et al.<sup>17</sup> encontraram diferentes porcentagens de marcação nas diversas regiões bucais e relatam que este fato pode indicar uma diferença biológica da neoplasia. Este fato pode ser explicado considerando-se o melhor comportamento biológico de um carcinoma epidermóide que ocorre no lábio inferior ou em qualquer outra localização intrabucal, explicando mais uma vez a relação da maior expressão da ciclina D1 e prognóstico desfavorável. Os autores talvez não tenham observado esta diferença devido ao fato de, na maioria dos casos, não terem trabalhado com carcinoma epidermóide de lábio inferior.

Na Tabela 1 podemos observar as porcentagens de células marcadas em cada estadiamento clínico. O interessante é que esperávamos uma porcentagem de células marcadas semelhante entre T1 e T2 e em menor proporção que as de T3 e T4, também aproximadamente iguais. Não foi o que aconteceu: o resultado de T1 foi de 23,8% de células positivas para a ciclina D1 e uma aproximação entre os valores de T2, T3 e T4, com 41,2%, 40,7% e 42,7%, respectivamente. O trabalho de FRACCHIOLLA et al.<sup>15</sup> mostrou maior expressão da ciclina D1 nos estadiamentos clínicos mais avançados (T3 e T4) em carcinoma epidermóide de laringe. Outros trabalhos pesquisaram esta relação, mas não encontraram significância<sup>16, 17, 20</sup>.

A ciclina D1 é um regulador positivo da progressão da fase G1 para S e vários experimentos mostram que a superexpressão da ciclina D1 leva ao encurtamento da fase G1, causando um aumento da proliferação celular. A ciclina D1 está presente no início da formação do carcinoma, envolvida no desenvolvimento e crescimento tumoral<sup>15</sup>. A superexpressão da ciclina D1 pode estar relacionada com o crescimento local do carcinoma. A partir dos dados da literatura e frente aos resultados encontrados pode-se constatar que a partir de T2, o carcinoma apresenta maior expressão da ciclina D1, havendo uma maior proliferação celular com risco aumentado de invasividade local, representando uma maior instabilidade gênica nos carcinomas T2, T3 e T4. Entretanto, seria importante avaliar o papel da ciclina D1 nos diferentes estádios da carcinogênese.

Esses dados sugerem que a ciclina D1 pode estar envolvida na patogenia de carcinomas mais agressivos. Entretanto, há necessidade de mais estudos, com maiores casuísticas, para indicar a ciclina D1 como marcador de prognóstico em carcinoma epidermóide de boca.

Um fator que pode ter contribuído para a não significância dos nossos resultados foi o relativo pequeno

número de casos analisados. Observamos em alguns trabalhos da literatura resultados semelhantes aos nossos, como o de MINETA et al.<sup>20</sup>, entretanto, os autores trabalharam com 94 pacientes. Porém, de uma forma geral, o número médio de casos relatados na literatura varia de 20 a 50 pacientes.

Em situação normal de divisão celular controlada, a proteína p16 funciona como um regulador negativo do ciclo celular, pois bloqueia sua progressão na fase G1. Acredita-se que a perda desse mecanismo de controle negativo da divisão celular favorece a ocorrência dos primeiros passos necessários para a cancerização.<sup>13</sup>

Sendo o p16 um gene supressor de tumor poderíamos presumir que ele estaria inibido nos carcinomas. Porém, uma provável explicação para o número aumentado de células que expressam o p16 durante a carcinogênese seria a proliferação epitelial e conseqüente transformação, resultar do acúmulo de p16 aberrante.

A relação entre a expressão imunoistoquímica do p16 e o sistema TNM e localização do carcinoma epidermóide da região de cabeça e pescoço é raramente citada na literatura. Um dos poucos trabalhos encontrados foi o de PANDE et al.<sup>21</sup> que correlacionou a expressão imunoistoquímica do p16 com os dados clínicos (idade, sexo, TNM, uso do tabaco/betel) dos pacientes com carcinoma epidermóide de boca. Os autores observaram relação com o estadiamento do tumor, progressão e consumo de tabaco/betel.

TSAI et al.<sup>22</sup> estudaram, usando a biologia molecular, as alterações do gene p16 e relacionaram com os dados clínicos de pacientes com carcinoma epidermóide bucal. Encontrou-se correlação apenas com a presença de metástase em linfonodos regionais. Já LIN et al.<sup>23</sup> observaram metilação mais freqüente em carcinomas de língua quando comparados com o de outra localização em pacientes que consumiam tabaco/betel.

Os resultados não revelaram qualquer relação entre a expressão imunoistoquímica do p16, a localização e o Sistema TNM. Analisando a Tabela 2 observamos que as porcentagens de células positivas foram aproximadamente iguais nas duas variáveis.

Deve-se ressaltar que a maioria dos trabalhos da literatura não se preocupa em relacionar a expressão do p16 com dados clínicos e sim avaliar a presença e tipo de alteração que ocorre neste gene supressor de tumor, aplicando-se para tal, estudos moleculares. Ainda, não tem sido amplamente defendida a hipótese de se utilizar o p16 como marcador de prognóstico nas neoplasias malignas.

É importante relatar que os resultados do p16 mostraram muita aproximação das porcentagens de células positivas em relação às variáveis analisadas,

diferindo dos resultados encontrados para a ciclina D1, que mostraram tendência em ser estatisticamente significativo. Então, baseando-se nos resultados encontrados, pode-se sugerir que, ao fazer escolha entre um dos dois marcadores de ciclo celular, ciclina D1 e p16, para se predizer o prognóstico de um carcinoma de boca, a escolha sempre deve recair sobre a ciclina D1.

A partir da análise da expressão imunoistoquímica da ciclina D1 e do p16 em carcinomas epidermóides de boca e sua relação com o Sistema TNM e localização podemos concluir que não se observou diferença estatisticamente significativa entre o número médio de núcleos positivos para a ciclina D1 e o p16 em relação ao sistema TNM e a localização do carcinoma epidermóide de boca. Porém, observamos que houve menor porcentagem de marcação para a ciclina D1 nos carcinomas de lábio inferior e nos tumores classificados clinicamente como T1.

Com base nesses resultados podemos sugerir que houve um acúmulo nuclear de p16, mas este resultado não tem significância no prognóstico. Entretanto, os resultados da ciclina D1 não mostraram que ela é um marcador absoluto de prognóstico, mas sugere que o aumento do nível de ciclina D1 contribui, junto com outros oncogenes, no processo de progressão tumoral.

#### REFERÊNCIAS

- Collins K, Jacks T, Pavletich NP. The cell cycle and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:2776-8.
- Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994;266:1821-8.
- Jinno S, Lin J, Yageta M, Okayama H. Oncogenic cell cycle start control. *Mutat Res*. 2001;477:23-9.
- Michalides RJ. Cell cycle regulators: mechanism and their role in aetiology, prognosis, and treatment of cancer. *J Clin Pathol*. 1999;52:555-68.
- Sherr CJ. The pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res*. 2000;60:3689-95.
- Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science*. 1996;274:1672-7.
- Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. Inactivation of p14ARF, p15INK4B, p16INK4A gene is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2001;37:498-504.
- Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer*. 1999;35:531-9.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK 4. *Nature*. 1993;366:704-7.
- Chen QM, Luo G, Li BQ, Samaranyake LP. Expression of p16 and CDK4 in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinoma: a semi-quantitative immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 1999;28:158-64.
- Akanura D, Uzawa N, Yoshida MA, Negishi A, Amagasa T, Ikeuchi T. Inactivation patterns of the p16 (INK4a) gene in oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol*. 1999;35:476-83.
- Bánkfalvi A, Pinffkò J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: a role of the invasive tumor front. *J Oral Pathol Med*. 2000;29:291-8.
- Parise O Jr. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000.
- Castle JT, Cardinali M, Kratochvil J, Abbondanzo SL, Kessler HP, Auclair PL, et al. p53 and cyclin D1 staining patterns of malignant and premalignant oral lesion in age-dependent populations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;88:326-32.
- Fracchiolla NS, Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Capaccio P, Boletini A, et al. Molecular and immunohistochemical analysis of the bcl-1/cyclin D1 gene in laryngeal squamous cell carcinomas. *Cancer*. 1997;79:1114-21.
- Kuo MYP, Lin CY, Hahn LJ, Cheng S, Chiang CP. Expression of cyclin D1 is correlated with poor prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med*. 1999;28:165-9.
- Lam KY, Ng IO, Yuen APW, Kwong DLW, Wei W. Cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinomas: clinicopathological relevance and correlation with p53 expression. *J Oral Pathol Med*. 2000;29:167-72.
- Mathew R, Arora S, Khanna R, Shukla NK, Mathur M, Ralhan R. Alteration in Cyclin D1 expression in esophageal squamous cell carcinoma in the Indian population. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2001;127:251-7.
- Michalides RJ, Van Veelen N, Kristel PMP, Hart AAM, Loftus BM, Hilgers FJM, et al. Overexpression of cyclin D1 indicates poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1997;123:497-502.
- Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Ueda Y, Misawa K, Harada H, et al. Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2000;36:194-8.
- Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol*.

- 1998;34:396-403.
22. Tsai C, Yang C, Chou LS, Chou M. The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2001;30:527-31.
23. Lin S, Chang K, Chang C, Liu T, Tzeng Y, Yang F, et al. Alterations of p16/MTS1 gene in oral squamous cell carcinomas from Taiwanese. *J Oral Pathol Med.* 2000;29:159-66.