



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE NA REGIÃO 9p EM
PORTADORES DE TUMORES MALIGNOS DE CAVIDADE
BUCAL

CURITIBA
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GUSTAVO BOMFIM PROPST

ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE NA REGIÃO 9p EM
PORTADORES DE TUMORES MALIGNOS DE CAVIDADE
BUCAL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Genética, do Departamento de Genética, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Enilze
Maria de Souza Fonseca Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Iglénir
João Cavalli

CURITIBA
2007

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 - TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO E CAVIDADE BUCAL	11
1.1.1 EPIDEMIOLOGIA.....	13
1.1.2 FATORES DE RISCO	15
1.1.3 CLASSIFICAÇÃO.....	18
1.1.4 - DIAGNÓSTICO	19
1.1.5 - TRATAMENTO E PROGNÓSTICO.....	20
1.1.6 - PREVENÇÃO	21
1.2 - PERDAS DE HETEROZIGOSE (LOH) E SUA ASSOCIAÇÃO COM O CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	22
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	30
4.2 COLETAS DO SANGUE PERIFÉRICO E DO TECIDO TUMORAL.....	35
4.3 - EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO.	35
4.4 - EXTRAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS DE TECIDO TUMORAL.....	36
4.5 - QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA	38
4.6 - AMPLIFICAÇÃO DO DNA - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	38
4.7 - ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE (LOH)	42
4.8 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	44
5. RESULTADOS.....	45
5.1 - MARCADORES MICROSSATÉLITES POLIMÓRFICOS EM 9P	45
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÕES	61
8. REFERÊNCIAS	61
9. ANEXOS	69

RESUMO GUSTAVO PROPST

Os tumores de cabeça e pescoço apresentam uma alta incidência no Brasil, permanecendo como uma das neoplasias com menor tempo de sobrevivência para o paciente. Os métodos atuais para o diagnóstico e tratamento desses tipos de tumores não têm se mostrado eficazes, o que torna necessários os avanços no estudo dos padrões genético-moleculares da doença.

Alterações genéticas no braço curto do cromossomo 9 (9p), sugerem que esta região possa conter genes supressores tumorais, como os genes *CDKN2A*, *CDKN2B* e *INFA*, envolvidos no início e/ou progressão deste tipo de tumor. O envolvimento da região 9p foi investigado pela análise de marcadores microssatélites quanto à presença de perdas de heterozigose (LOH) em 74 pacientes provenientes de Curitiba e Londrina-PR. Nas análises de LOH, foi utilizado DNA de sangue periférico de cada paciente como controle e DNA tumoral obtido de peças a fresco para a avaliação das perdas alélicas. As reações de PCR foram realizadas utilizando-se iniciadores marcados com agentes fluorescentes HEX (D9S200, D9S1748 e D9S157) e FAM (D9S169, D9S1749 e D9S171). Após eletroforese em Seqüenciador *MegaBace 1000*, os produtos foram analisados pelo software *Fragment Profiler*. Os cálculos para a obtenção das freqüências de LOH foram realizados na sequencia. Em todos os locos analisados foram encontradas freqüências de LOH elevadas, variando de 21,31% a 51,51%. Dos seis marcadores analisados, dois (D9S157 e D9S200) mostraram freqüências de LOH superiores a 50%. A análise da freqüência de LOH em locos combinados também mostrou uma alta taxa de perda alélica, variando de 57,33% (em pelo menos um dos locos) a 8% (em quatro dos seis locos possíveis). Os marcadores microssatélites foram correlacionados a parâmetros histopatológicos e clínico. Apenas o parâmetro invasão de linfonodos regionais apresentou um resultado significativo para a análise conjunta dos marcadores ($\chi^2_1=4,121$; $P<0,05$). Nosso estudo demonstra uma alta incidência de perda de heterozigose no cromossomo 9 em 9p21 e 9p22-23, em carcinomas de células escamosas de cavidade bucal, sugerindo a existência de possíveis genes supressores de tumor nestas regiões,

além dos já clonados e possivelmente envolvidos na tumorigênese bucal, *INFA* e *CDKN2A*.

1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma das principais causas de morte em todo o mundo. O Instituto Nacional do Câncer (INCA), do Ministério da Saúde, estimou 472.050 casos novos da doença para o ano de 2006 no Brasil. Os tipos que mais atingem a população brasileira são os cânceres de pele não-melanoma, seguidos pelas neoplasias de mama, próstata, pulmão e estômago (INCA, 2006). Devido a grande morbidade e mortalidade em todo o mundo, o investimento na pesquisa e, conseqüentemente grandes avanços foram realizados nos últimos 20 anos quanto ao conhecimento da etiopatologia, diagnóstico, prognóstico e terapêutica do câncer.

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo formar tumores em outras regiões do corpo, o que se denomina metástase. Por outro lado, um tumor benigno se constitui em uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida (INCA, 2006). Células aberrantes, cuja regulação da multiplicação celular esteja comprometida, podem gerar descendentes que herdaram a propensão para proliferar sem responder à regulação, resultando em uma proliferação celular clonal capaz de se expandir indefinidamente. Essa expansão resulta na formação de massas tumorais que, quando têm o potencial de invadir tecidos e se disseminar, são consideradas malignas e denominadas câncer. Portanto, o câncer é considerado uma doença associada a alterações genéticas múltiplas, gerado a partir de uma única célula

normal que acumulou mutações após um processo de evolução clonal (CAVENEY e WHITE, 1995).

A transformação de uma célula somática normal em uma célula tumoral representa um processo em etapas, no qual pelo menos quatro a sete alterações genéticas ocorrem em um período de vários anos (VOGELSTEIN e KINZLER, 1993), o que explica em parte o porquê do câncer ser considerado uma doença associada ao envelhecimento. Em geral, as mutações incluem perdas, ganhos ou rearranjos genéticos, além de alterações pontuais na seqüência do DNA (SUGIMURA, 1998). As alterações necessárias para o surgimento de um tumor envolvem diversos genes, a maioria destes relacionada com a proliferação e diferenciação celular (LEE et al., 2000). Essas alterações incluem principalmente a expressão aumentada ou ativação mutacional de proto-oncogenes (FEARON e VOGELSTEIN, 1990) e a inativação de genes supressores de tumor (WEINBERG, 1991). Além destas, podem ocorrer também alterações nos genes de reparo de danos ao DNA (HOEIJMAKERS, 2001), instabilidades cromossômicas (LENGAUER et al., 1998), reativação da telomerase (GREIDER e BLACKBURN, 1996) e alterações epigenéticas (ROUNTREE et al., 2001). Estas últimas incluem alterações globais, como hipometilação do DNA e hipoacetilação da cromatina, assim como hiper e hipometilações gene-específicas. A hipometilação global do DNA leva a instabilidades cromossômicas, o que aumenta a freqüência de tumores, como demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo*, assim como a ativação gene-específica de oncogenes como o *R-ras* em cânceres de estômago (FEINBERG, 2005)

Os oncogenes representam formas alteradas dos proto-oncogenes celulares que controlam uma variedade de processos associados com a proliferação e a diferenciação celular (WEINBERG, 1985). Essas alterações, e conseqüente ativação dos proto-oncogenes, se dão através de translocações cromossômicas, ampliações gênicas ou mutações de ponto (KNUDSON, 1985), de maneira que alterações em um único alelo são suficientes para a transformação maligna da célula. Entre os principais agentes que podem promover tal ativação encontramos as radiações, infecções virais e exposição aos carcinógenos ambientais. Como conseqüência dessas alterações, a expressão dos oncogenes pode levar a uma proliferação anormal das células e à formação do tumor (COOPER, 1994). Devido à sua capacidade de transformar células, apesar da expressão residual dos alelos normais, os alelos mutantes dos proto-oncogenes são considerados dominantes.

Outros genes de grande importância para o estudo do câncer são os supressores de tumor que, por sua vez, atuam como reguladores negativos da proliferação celular, retardando a progressão do ciclo celular e assim bloqueando a diferenciação ou induzindo a morte celular programada por apoptose. Alterações que levem a uma inativação destes genes liberam a célula da inibição regulada pelos mesmos em determinadas fases do ciclo celular (pontos de checagem), levando à proliferação desordenada, característica da célula cancerosa (WEINBERG, 1991). Alterações nos genes supressores de tumor levam à perda de função e são consideradas recessivas, pois são apenas inativados quando ambos os alelos são alterados (BIÈCHE e LIDERAU, 1995), com raras exceções .

O modelo clássico de desencadeamento de um tumor por perda de genes supressores de tumor, foi sugerido por KNUDSON (1971) com o estudo do

Retinoblastoma, um raro tumor ocular, que ocorre mais comumente na infância. Segundo este modelo, este tumor é causado por duas alterações sucessivas no genoma. Na forma esporádica, observada em crianças sem história familiar da doença, esse autor propôs a ocorrência de duas mutações somáticas nas células da retina. Para a forma familiar, propôs que uma das mutações seria transmitida hereditariamente e a outra seria somática. O mecanismo descrito para o retinoblastoma se aplica à grande maioria dos outros genes supressores de tumor, ou seja, quando os alelos mutados são transmitidos pela linhagem germinativa, eles conferem uma susceptibilidade herdada ao câncer e levam às formas familiares. Já quando os alelos são inativados por mutações nas células somáticas, desenvolvem-se formas esporádicas dos mesmos tumores. O silenciamento de genes supressores de tumor também está associado com promotores de hipermetilação do DNA e da hipoacetilação da cromatina, o que afeta diversos genes, tais como o *RB1*, *CDKN2A*, *VHL* e *MLH1* (FEINBERG, 2005).

Na inativação de genes supressores, os mecanismos que levam à perda de seqüências podem também envolver regiões cromossômicas próximas ao gene. Assim, marcadores de DNA que demonstravam heterozigose antes da progressão do tumor sofrem uma redução até atingirem a perda alélica parcial ou total, mecanismo conhecido como perda de heterozigose ou LOH (WEINBERG, 1991).

A análise de microssatélites, seqüências de DNA na qual dois a seis nucleotídeos são repetidos numerosas vezes em “tandem” (YEE et al., 1994), constitui-se em um método bastante informativo na pesquisa da perda de heterozigose. Assim, a detecção da perda de heterozigose persistente em um loco específico é um método indireto para se pesquisar a possível localização de um

gene supressor de tumor.

A ativação de oncogenes e a inativação dos genes supressores tumorais representam, portanto, eventos complementares no desenvolvimento do câncer, ambos contribuindo para aumentar a proliferação celular e a perda do controle do crescimento normal (COOPER, 1994).

Além do envolvimento de oncogenes, genes supressores e outros genes ligados ao ciclo celular, verifica-se que processos ligados a senescência são, por si só, causadores de instabilidade genômica. Sabe-se que a incidência de câncer em seres humanos aumenta exponencialmente com a idade, referendando a sugestão de que múltiplas alterações genéticas são necessárias para a tumorigênese (VOGELSTEIN e KINZLER, 1993). Entre as várias hipóteses para explicar esta associação, inclui-se o acúmulo de lesões no DNA devido à diminuição da capacidade de reparo. Fica claro, portanto, que um sistema de reparo eficiente é fundamental na manutenção da integridade do genoma e que a susceptibilidade de uma determinada célula sofrer transformação está diretamente relacionada à sua capacidade em metabolizar carcinógenos (endógenos e exógenos) e em reparar o seu DNA.

Ao contrário de outras doenças genéticas, que costumam ser causadas por mutações na linhagem germinativa, o câncer é causado, na maioria dos casos, por mutações em células somáticas, devido a interações genético-ambientais (PERERA, 1997). Mesmo assim, cerca de 5% a 10% dos casos da doença são hereditários, ou seja, causados por mutações que foram herdadas e que predisõem ao desenvolvimento de tipos específicos de câncer (FEARON, 1997). De um modo geral, o aparecimento de um tumor está associado com a ocorrência

de alterações genéticas que se acumulam progressivamente no DNA de uma célula normal. Dessa forma, o câncer pode ser considerado como uma doença genética e a identificação e caracterização dos genes alterados são fundamentais para a compreensão das bases moleculares da doença. Além disso, a identificação desses genes consiste também no primeiro passo para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais sensíveis e de terapias mais individualizadas e eficazes (PARMIGIANI e CAMARGO, 2004).

1.1 - TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO E CAVIDADE BUCAL

Os cânceres de cabeça e pescoço são responsáveis por uma substancial morbidade e mortalidade. Os sítios anatômicos do trato aéreo digestivo superior acometidos compreendem a cavidade bucal, faringe, nasofaringe, hipofaringe, fossa nasal, laringe e glândulas (CANEVARI e ROGATTO, 2004), incluindo-se, como tumores da cavidade bucal, aqueles que acometem o lábio, língua, gengiva, assoalho da boca, palato, glândulas salivares, tonsilas e orofaringe (LIPPMANN e HONG, 2001).

Na maioria dos estudos, os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço dos diferentes locais anatômicos da região são tratados como um único tipo de tumor. Embora a classificação histológica atual agrupe estas neoplasias em apenas uma, estes tumores se comportam diferentemente nos variados locais da cabeça e do pescoço, sugerindo diferentes bases biológicas. Estas diferenças se refletem no padrão de crescimento, comportamento clínico e prognóstico. Por exemplo, a diferenciação de tumores de cavidade bucal é geralmente mais rápida e acentuada em comparação a cânceres de orofaringe (SHANTZ et al., 1997).

Além disso, carcinomas de orofaringe têm uma maior tendência à recorrência local e à metástase, em contraste com tumores de cavidade bucal e de laringe. Em particular, tumores de hipofaringe são geralmente mais agressivos do que tumores localizados em outras regiões da cabeça e do pescoço (SESSIONS et al., 1997).

Características anatômicas locais podem também desempenhar um papel na diferença do comportamento clínico. A laringe é um órgão unicamente complexo, portanto uma alteração significativa em sua anatomia intrínseca, por câncer ou cirurgia, possui um grande impacto na fisiologia dos tratos aerodigestivo e respiratório. Entretanto, é com as lesões de laringe que o tratamento conservativo se mostra mais eficiente. Já os tumores da hipofaringe crescem em uma área de abundante drenagem linfática e demonstram um comportamento caracterizado por dispersão local difusa, metástase precoce e uma taxa relativamente alta de dispersão distante. Dessa forma, o tratamento é dificultado, não sendo surpreendente que a taxa de sobrevivência de portadores de cânceres de faringe seja baixa.

As diferenças no comportamento clínico destes tumores não apenas sugere complicações únicas associadas a seus respectivos locais anatômicos, mas também indicam diferenças intrínsecas no comportamento biológico dos tumores. A razão para esta considerável diversidade em aspectos clínicos e biológicos, incluindo diferenças imprevisíveis na resposta à terapia, é desconhecida, mas é provavelmente devido, pelo menos em parte, a alterações funcionais em diferentes conjuntos de genes supressores tumorais e oncogenes nos variados tumores (BAATENBURG DE JONG et al., 1993; ANDL et al., 1998). Apesar desta diversidade no comportamento biológico e de suas altas frequências, as

alterações genéticas que estão envolvidas na transformação e progressão das lesões de cabeça e pescoço permanecem pouco estudadas. Dessa forma, é crucial estabelecer marcadores moleculares específicos que podem levar à caracterização dos diferentes subtipos de tumores de cabeça e pescoço (WARNALULASURIYA, 2000).

O câncer de cavidade bucal é considerado o tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço (LIPPMAN e HONG, 2001). O carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo histológico que mais prevalece, estando presente em mais de 90% dos casos de neoplasias bucais (SILVERMAN, 1998; 2001; NEVILLE et al., 2002).

1.1.1 EPIDEMIOLOGIA

De acordo com NAGPAL e DAS (2003), o processo de carcinogênese bucal está associado com alterações genéticas que se acumulam, possibilitando a atuação do grande número de agentes ambientais potenciais aos quais os indivíduos são expostos. Esse tipo de tumor é considerado o sexto mais comum em todo o mundo, estando entre as principais causas de óbito por câncer (INCA, 2006). Em todo o mundo, milhares de novos casos de câncer bucal são detectados anualmente. Só no Brasil são mais de 10.000 casos e sua incidência vem aumentando muito nos últimos anos (CLARK, 1999). Os óbitos causados por esse tumor são comparáveis aos atribuídos aos cânceres de mama, cervicais e melanomas (JOHNSON e WARNAKULASURIYA, 1993).

A distribuição mundial do câncer de boca é bastante variável, mas as maiores incidências ocorrem na Índia (BARTSCH, 2000) e Sri Lanka, onde esta neoplasia corresponde a cerca de 40% de todos os casos diagnosticados (CLARK, 1999).

Esse tipo de tumor é menos comum em países desenvolvidos, apesar de um aumento na incidência ter sido descrito no oeste e centro da Europa. Entretanto, ele está altamente disseminado nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, como no sudeste da Ásia, na África e no Brasil, principalmente em indivíduos pertencentes às classes econômicas menos favorecidas. Isto é devido principalmente ao uso excessivo de álcool e tabaco, além da falta de atendimento médico e odontológico adequados. Conseqüentemente, o diagnóstico da doença se dá tardiamente, resultando em uma maior incidência de casos nestas regiões (SCULLY e PORTER, 2000).

No Brasil, onde a maioria da população não tem acesso adequado à saúde pública, incluindo a odontológica, bem como à higiene e alimentação adequadas, os tumores de cavidade bucal têm uma alta incidência. A estimativa de incidência de câncer para 2007 no Brasil aponta este tumor como o 7º mais freqüente entre os homens (com 10.060 casos estimados) e o 10º entre as mulheres (com 3.410 casos estimados). No estado do Paraná, foram estimados 1080 casos novos, com 210 só em Curitiba (INCA, 2006). Para o sexo masculino, o câncer de boca é considerado como o quarto tipo mais comum de câncer, sendo menos freqüente do que os tumores de pele não melanoma, pulmão, estômago e próstata. Nas regiões sul e sudeste do Brasil, a cidade de São Paulo registra isoladamente a mais alta incidência das Américas (WÜNSCH-FILHO e CAMARGO, 2001 e WÜNSCH-FILHO, 2002).

De um modo geral, o tumor de cavidade bucal é principalmente encontrado em indivíduos de meia idade do sexo masculino, fumantes e de renda baixa (CLARK, 1999; SCULLY e PORTER, 2000). Existem evidências do aumento desta

neoplasia entre as mulheres. Sabe-se que a mais alta incidência neste sexo é encontrada em mulheres asiáticas, estando relacionada com hábitos culturais de consumo de tabaco (CLARK, 1999). A razão entre homens e mulheres é de 1,5:1, entretanto, nos últimos anos, esta razão tem se mostrado em declínio (McMAHON e CHEN, 2003).

1.1.2 FATORES DE RISCO

Acredita-se que a distribuição dos fatores de risco varie consideravelmente nas diferentes populações devido a fatores culturais (CANEVARI e ROGATTO, 2004). Parece não haver um agente ou fator causal (carcinógeno) claramente definido para o carcinoma bucal, pois tanto fatores extrínsecos quanto intrínsecos podem atuar. Provavelmente, mais de um fator seja necessário (DAMM e BOUQUOT, 1998).

O uso do tabaco em todas as suas formas, inclusive o ato de mascar fumo, é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer bucal, atuando isoladamente ou em conjunto com o álcool (SCULLY e PORTER, 2000). O risco para tabagistas exagerados, que fumam cerca de 80 cigarros por dia, é cerca de 17 vezes maior que o risco em não fumantes. Isso se deve ao fato de que o tabaco contém mais de três mil substâncias, e aproximadamente 300 destas são consideradas carcinógenas, capazes de serem convertidas em metabólitos reativos e interagirem com o DNA pela ação de enzimas oxidativas (CANAVERI e ROGATTO, 2004).

Em relação ao consumo de álcool, sabe-se que este pode levar a deficiências nutricionais, aumentando a susceptibilidade a carcinógenos e também

à supressão imunológica. Embora seja desconhecido o mecanismo pelo qual o álcool induz a carcinogênese, as células basais e epiteliais da cavidade bucal devem ser também alteradas por altas concentrações de etanol diretamente na mucosa exposta e, subseqüentemente, por concentrações mais altas de carcinógenos e pró-carcinógenos. O uso moderado a intenso do álcool parece aumentar de três a nove vezes o risco de câncer de boca (LAZARUS e PARK, 2000; CANEVARI e ROGATTO, 2004).

Aproximadamente um terço dos pacientes com carcinoma bucal é consumidor de bebidas alcoólicas, sendo que a cirrose hepática é encontrada em pelo menos 20% dos pacientes do sexo masculino (DAMM e BOUQUOT, 1998). Foi demonstrado que pacientes com câncer de laringe que continuam a fumar e a beber após o diagnóstico têm probabilidade de cura diminuída e aumento do risco de aparecimento de um segundo tumor primário na área da cabeça e pescoço. No Brasil, a interação álcool-tabaco é responsável por níveis de incidência de câncer bucal comparáveis aos da Índia (HAMADA et.al., 1991 e SCHLECHT et.al., 1999).

Existem poucas evidências de que a deficiência na higiene bucal, o uso de anti-sépticos ou infecções de origem viral tenham papel importante no desenvolvimento deste tipo de carcinoma (JOHNSON, 1991). Alguns estudos sugerem que o papilomavírus humano (HPV) pode estar associado a alguns tipos de câncer bucal, já que este é encontrado em 14% a 22% dos portadores da doença (SUGERMAN e SHILLITOE, 1997). Uma maior incidência também foi relatada em pacientes infectados pelo HIV, provavelmente devido à imunossupressão (FLAITZ et al., 1995). Outras doenças infecciosas, como sífilis ou candidíase, bem como a desnutrição e a anemia, são fatores que podem

predispor o indivíduo ao desenvolvimento destas lesões. O consumo de frutas e vegetais pode apresentar um efeito protetor (DAMM e BOUQUOT, 1998; CLARK, 1999; SCULLY e PORTER, 2000), especialmente daqueles ricos em vitaminas A, C e betacaroteno, que estariam inversamente relacionados ao risco de câncer bucal. Enquanto isso, o consumo de carnes e pimentas vermelhas é considerado como fator de risco (FRANCO *et al.*, 1989). RODRIGUEZ *et al.* (2004) encontraram associação positiva entre baixo consumo de vegetais e desenvolvimento de tumores bucais, além de terem encontrado um efeito protetor para o consumo de frutas e café. Quando combinaram a alimentação ao hábito tabagista e etilista, os mesmos autores correlacionaram estes três fatores a 85% dos casos de câncer em pacientes com idade inferior a 46 anos.

Apesar de fumo e álcool serem reconhecidos como os principais fatores de risco, estudos prévios encontraram relação entre o câncer bucal e o exercício de determinadas ocupações, como por exemplo: pescadores e agricultores, pintores, instaladores de carpetes, dentre outros. Exposições ocupacionais a substâncias químicas específicas também têm sido apontadas como relacionadas às neoplasias bucais, tais como formaldeído e herbicidas. No Brasil não existem pesquisas reportando especificamente os efeitos da ocupação na gênese do câncer da cavidade bucal (ANDREOTTI *et al.*, 2006). Segundo CANEVARI e ROGATTO (2004), em conjunto, os fatores de risco não explicam adequadamente todos os casos de carcinomas de cabeça e pescoço e esta disparidade sugere a existência de uma susceptibilidade genética individual para o desenvolvimento destes tumores.

Tumores de cabeça e pescoço de origem familiar são raros, apesar de haver do crescente interesse científico atual. Incluem paragangliomas, neoplasias endócrinas tipo I (MEN I) e II (MEN II), tumores associados à neurofibromatose e carcinomas nasofaríngeos. Em relação a esses últimos, o gene candidato ideal é o *CDKN2A (P16)*, mapeado em 9p21 (SUAREZ et.al., 2006). Quanto ao câncer bucal, a discreta associação encontrada por alguns autores parece refletir o efeito do ambiente comum de exposição ao cigarro e álcool.

Segundo BIAZEVIC et al. (2006), níveis sócio-econômicos mais ou menos elevados de provisão, acesso e efetividade dos serviços de saúde poderão propiciar condições mais favoráveis para a prevenção, para o diagnóstico precoce e redução de incapacidades, para a implementação dos recursos terapêuticos e um melhor prognóstico para os pacientes afetados. Considerando todos estes fatos e o lento progresso na oncologia de cabeça e pescoço, torna-se importante a investigação genética na tentativa de identificar marcadores moleculares para esta doença (SUDBO et al., 2001).

1.1.3 CLASSIFICAÇÃO

Mais de 90% dos tumores de cavidade bucal são do tipo histológico carcinoma de células escamosas. Os principais tipos de cânceres encontrados na cavidade bucal são (ZAKRZEWSKA, 1999):

- Carcinomas epiteliais;
 - de células escamosas;
 - verrucosos;
 - de células fusiformes;

- adenóide-escamosos.
- de células basais;
- melanomas.
- Odontogênicos;
- Tumores ósseos primários;
- Tumores de glândulas salivares;
 - mucoepidermóides;
 - de células actínicas;
 - adenocarcinomas.

1.1.4 - DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do câncer bucal no Brasil é, em geral, realizado mais tardiamente do que em países desenvolvidos (CARVALHO et al., 2004).

Segundo ZAKRZEWSKA (1999), o diagnóstico e o prognóstico de tumores de cavidade bucal dependem tanto de um profissional de saúde, como médicos e cirurgiões dentistas, quanto do paciente identificarem as lesões ou algum de seus sintomas em estágio inicial. O carcinoma de células escamosas se apresenta de diferentes maneiras, mas a maior parte das lesões iniciais é assintomática. Algumas lesões malignas apresentam pequenas úlceras indolores, enquanto outras lesões de malignidade intermediária podem apresentar ulceração persistente com fixação dos tecidos adjacentes e aumento de linfonodo regional. Sendo grande parte das lesões assintomática, o profissional deve suspeitar, sobretudo, de indivíduos que apresentem lesões pré-malignas e que venham sendo expostos aos fatores de risco, como cigarro e álcool. A biópsia é

considerada o melhor e mais simples método de diagnosticar o câncer bucal. Radiografias intrabucais da maxila e mandíbula, assim como a tomografia computadorizada, podem auxiliar a definir a extensão da lesão e o envolvimento ósseo e nodular.

1.1.5 - TRATAMENTO E PROGNÓSTICO

A cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia são, isolada ou associadamente, os métodos terapêuticos aplicáveis ao câncer de boca. Em se tratando de lesões iniciais, ou seja, restritas ao local de origem, sem extensão a tecidos ou estruturas vizinhas e muito menos a linfonodos regionais, e dependendo da sua localização, pode-se optar ou pela cirurgia ou pela radioterapia, visto que ambas apresentam resultados semelhantes, expressos por um bom prognóstico (cura em 80% dos casos). Nas demais lesões, se passíveis de cirurgia, esta é indicada, associada ou não à radioterapia. Tradicionalmente a quimioterapia tem sido utilizada apenas em casos de recorrência da doença ou presença de metástase (INCA, 2006).

A radioterapia é mais utilizada para diminuir o tamanho do tumor antes da cirurgia ou para prevenir recorrências e eliminar tecido residual após a mesma. Já a quimioterapia é usada quase que somente como tratamento paliativo, quando há recorrência local ou metástases (EL-SAYED e NELSON, 1996). Alguns dos agentes comumente empregados, com taxas de resposta que variam de 15% a 40%, incluem cisplatina, bleomicina, fluoracil, dentre outros (RODRIGUEZ-MONGE *et al.*, 1997).

O tamanho do tumor, a presença ou não de metástases e o envolvimento de linfonodos regionais são os melhores indicadores de prognóstico do paciente (DAMM e BOUQUOT, 1998; NAGPAL e DAS, 2003). A taxa de sobrevida de cinco anos livre da doença é de cerca de 70% se não houver ocorrido metástase ao diagnóstico, podendo variar de 30-50% na presença das mesmas (DAMM e BOUQUOT, 1998; SCULLY e PORTER, 2000; LIPPMAN e HONG, 2001).

Apesar dos avanços técnicos, a sobrevida dos pacientes com câncer de cavidade bucal tem permanecido inalterada ao longo dos anos. Acredita-se que isto resulte de uma combinação de diagnóstico tardio e terapia inadequada (DAMM e BOUQUOT, 1998). Relatos da literatura indicam ainda que o estilo de vida do paciente determine o sucesso do tratamento, pois, aqueles que mantêm a exposição aos agentes etiológicos, como cigarro e álcool, após o diagnóstico do tumor, apresentaram um pior prognóstico em relação a pacientes que optaram pelo abandono dos fatores de risco (SCULLY e PORTER, 2000).

1.1.6 - PREVENÇÃO

A prevenção primária ao câncer bucal envolve o não início ou o abandono do uso do tabaco, uma vez que a regressão de lesões pré-malignas foi observada em ex-fumantes (GUPTA et al., 1995). Outras medidas preventivas seriam a redução no consumo de bebidas alcoólicas, promoção da higiene bucal e uma consulta odontológica de controle a cada ano, principalmente para homens com mais de 40 anos de idade, fumantes e portadores de próteses mal ajustadas. Outra recomendação é a manutenção de uma dieta saudável (INCA, 2006).

Nesses indivíduos de maior risco, o exame clínico da boca deve ser realizado, primariamente pelo próprio paciente com o auto-exame e, após suspeita de lesão, pelo cirurgião-dentista. Esse profissional deve ser extremamente cuidadoso no exame, permitindo assim a identificação precoce de lesões pré-malignas e de cânceres bucais de tamanho reduzido. A detecção precoce da doença ainda é considerada a forma mais efetiva de prevenção (JOVANOVIC et al., 1992).

1.2 - PERDAS DE HETEROZIGOSE (LOH) E SUA ASSOCIAÇÃO COM O CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

As mutações responsáveis pelo desenvolvimento do câncer podem ser cromossômicas e/ou gênicas. No caso de genes supressores de tumor, nos quais há a necessidade de inativação dos dois alelos, o primeiro geralmente é inativado por mutação gênica e o segundo é perdido por deleções cromossômicas envolvendo a região na qual o gene em questão está localizado, o que é denominado perda de heterozigose (LOH) (ROSSI e PINHO, 1999).

A LOH de marcadores genéticos polimórficos é interpretada como a deleção de segmentos genômicos. Quando esta perda é detectada como um evento somático específico do tecido tumoral, pode representar a deleção de um alelo de um gene supressor tumoral e indicar a localização de um alelo provavelmente mutado e, portanto, não-funcional, no cromossomo homólogo. Estas alterações confeririam uma vantagem no crescimento que levaria à expansão clonal das células em decorrência da inativação de um gene supressor tumoral (ANDO *et al.*,

2000). A análise de LOH pode caracterizar alterações não detectadas por outros métodos e o posterior mapeamento pode levar à identificação de novos genes supressores tumorais (KEMP, 1999).

Vários estudos demonstram que perdas alélicas detectadas por ensaios de LOH são freqüentes em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP). Uma alta freqüência de perda de heterozigose (LOH) envolvendo as regiões cromossômicas 3p, 5q, 8p, 9p, 9q, 11p e 17p foi encontrada em casos de carcinoma de células escamosas (AH-SEE et al., 1994). As maiores freqüências de LOH observadas ocorreram nos braços cromossômicos 3p, 9p e 17p (MAESTRO et al., 1993; AH-SEE et al., 1994), onde existem prováveis genes supressores tumorais ainda não clonados e os já clonados *VHL* (3p), *CDKN2A* (9p) e *TP53* (17p). A ocorrência de LOH nestas regiões foi associada com o desenvolvimento e a progressão da doença (CALIFANO et al., 1996; NAWROZ et al., 1996).

Alterações genéticas envolvendo os genes supressores de tumor *CDKN2A* e *TP53* são freqüentemente observadas em tumores de cabeça e pescoço. A inativação de ambos os genes citados parece estar envolvida nos estágios iniciais da doença (CALIFANO et al., 1996).

O gene supressor de tumor *CDKN2A* está localizado em 9p21 e codifica uma proteína que pertence a um importante grupo de inibidores de ciclinas dependentes de quinases (CDKIs), codificadas também pelos genes *CDKN2B* (*P15*), *CDKN1A* (*P21*) e *IFI27* (*P27*). Estes genes regulam a fase G1 do ciclo celular de uma forma negativa. O produto do gene *CDKN2A* liga-se à CDK4 e CDK6, inibindo suas associações com a ciclina D1. A inibição da atividade do

complexo ciclina D1/CDK4/6 previne a fosforilação da proteína pRB e a conseqüente liberação do fator de transcrição E2F, levando à interrupção do ciclo celular na transição G1-S (SERRANO et al., 1993). Alterações genéticas que inativem o gene *CDKN2A* podem levar à desregulação deste processo, contribuindo para o processo tumorigênico. Uma alta freqüência de LOH no braço curto do cromossomo 9 (9p21-22), onde o gene *CDKN2A* está localizado, foi encontrada em tumores de cabeça e pescoço, incluindo displasias e carcinomas *in situ* (CALIFANO et al., 1996), sugerindo o envolvimento dessa região com os estágios iniciais da doença.

ISHWAD et al. (1996) estudaram a LOH em 77 pacientes norte-americanos com carcinomas bucais utilizando 16 marcadores microssatélites distribuídos por cinco cromossomos diferentes. Destas amostras de tumores, 71% demonstraram LOH em um ou mais locos, sendo que uma significativa proporção de LOH foi observada nos cromossomos 3p (58%) e 9p (48%). Esses resultados sugerem que genes supressores de tumor, localizados nos braços curtos dos cromossomos 3 e 9 possam estar envolvidos com a patogênese de carcinomas bucais.

SUDBO et al. (2001) associaram a presença de LOH nos cromossomos 3p14, 9p21 ou em ambos com o desenvolvimento de tumores bucais, enquanto ROSIN et al. (2000), ARAI et al. (2002) e NUNN et al. (2003) correlacionaram a LOH envolvendo os cromossomos 3p, 4q, 8p, 9p, 11q, 13q e 17p a este mesmo tipo tumoral.

Diversos estudos de perda de heterozigose indicam que as perdas alélicas associadas com o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço ocorrem mais freqüentemente em 9p21-22, onde está

localizado o gene *CDKN2A*. Entretanto, XU et al. (2004) resolveram expandir o alvo de estudo e analisaram a LOH para esse mesmo tipo de carcinoma em 9p13-23, na tentativa de identificar outros possíveis genes supressores de tumor na região. Para tanto, foram analisadas 42 amostras pareadas de sangue e tumor de laringe, com 13 marcadores microssatélites altamente polimórficos usando a técnica da PCR. Destas amostras, 41 (97,6%) demonstraram LOH em pelo menos um dos marcadores utilizados para a região 9p13-23. O marcador mais freqüentemente deletado foi D9S162, com 17 em 19 (89,5%) das amostras informativas. Em outros marcadores também foram observadas LOH, como D9S171 (80%), D9S1748 (50%). Estes resultados demonstram que a alta freqüência de LOH em 9p13-23 indica a presença de pelo menos mais dois genes supressores de tumor ainda não identificados nessa região, que podem estar sendo inativados na progressão do carcinoma de células escamosas da laringe.

Com o objetivo de investigar a relação entre a perda de heterozigose (LOH) no cromossomo 9p e a patogênese de carcinomas de células escamosas bucais, XIAO et al. (2001) analisaram 24 amostras deste tipo de tumor utilizando oito marcadores microssatélites. Destas amostras, 10 (41,67%) demonstraram LOH em pelo menos um marcador de 9p. As maiores freqüências de LOH encontradas foram em 9p21, nos locos D9S171 (21,05%) e D9S304 (10,00%), e em 9p22-23, nos locos D9S168 (22,22%) e D9S162 (15,38%), concluindo que há uma alta freqüência de LOH nas regiões 9p21-23 nas amostras de tumor. Esse resultado indica a presença de mais de um gene supressor de tumor envolvido com a patogênese do carcinoma de células escamosas na região.

Em outro estudo, o gene *DBCCR1*, localizado no cromossomo 9q33 e identificado como um candidato a supressor de tumor por ser alvo freqüente de proteínas promotoras de hipermetilação em câncer de bexiga, foi investigado no desenvolvimento de carcinomas de células escamosas bucais (GAO et al., 2004). DNA de 34 tumores foram analisados quanto à presença de LOH em três marcadores próximos ao *DBCCR1* e a LOH foi encontrada em 10 dos 31 casos (32%), sugerindo que a LOH em 9q33 é um evento precoce e possivelmente freqüente no desenvolvimento de tumores bucais.

Em alguns tipos de tumores, a alta freqüência de deleção do gene supressor de tumor *DMBT1* (localizado no cromossomo 10) foi relatada, assim como a perda de heterozigose. Entretanto, ainda é pouco conhecida a provável relação entre esse gene e o carcinoma bucal de células escamosas. Para estudar as alterações genéticas no cromossomo 10 neste tipo de neoplasia, YAMASHITA et al. (2002) analisaram 38 amostras de carcinomas bucais primários e seus correspondentes tecidos normais para marcadores microssatélites correspondentes a 16 locos, dois deles na região do *DMBT1*. Perda de heterozigose (LOH) foi observada em pelo menos um dos 16 locos em 28 (73,7%) dos 38 casos, principalmente em D10S202 (34,6%) e D10S217 (28,6%). Esses resultados sugerem a presença de dois prováveis genes supressores tumorais associados com o carcinoma bucal de células escamosas. Os dois locos contendo o gene *DMBT1*, D10S209 e D10S587, tiveram alta freqüência de LOH comparativamente (20,0 e 22,7%, respectivamente), sugerindo um papel importante do *DMBT1* no desenvolvimento desse tipo de tumor.

Mais recentemente, CENGIZ et al. (2006) pesquisaram LOH no braço longo do cromossomo 2 utilizando-se de 16 marcadores microssatélites polimórficos em 39 amostras pareadas de epitélio bucal normal e neoplásico, e definiram o mapa de deleção da região com possíveis genes supressores de tumor. A LOH foi detectada em pelo menos um loco em 33 das 39 amostras de tecido tumoral (85%). Deleções freqüentes foram detectadas nas regiões dos marcadores D2S2304 (35%), D2S111 (40%), D2S155 (35%), D2S1327 (29%), D2S164 (29%), D2S125 (68%) e D2S140 (32%). Três regiões preferencialmente deletadas em 2q21-24, 2q33-35 e 2q37.3 foram mais observadas e, nelas, muitos genes candidatos a supressor de tumor foram localizados, como *LRP1B*, *CASP8*, *CASP10*, *BARD1*, *ILKAP*, *PPP1R7* e *ING5*. Uma análise molecular futura mais aprofundada de cada um destes genes foi proposta pelos autores para esclarecer se há influência dos mesmos na carcinogênese bucal.

Todos estes estudos demonstram que a pesquisa de LOH constitui-se em uma das melhores estratégias para a identificação de genes supressores de tumor, através da localização de regiões onde se observa perda de alelos nos diversos tipos de câncer. Assim, os sítios de alterações genéticas em tumores de cavidade bucal podem ser identificados utilizando-se marcadores microssatélites ou através de outras investigações moleculares, como a Hibridização Genômica Comparativa (CGH) ou CGH-array.

2. JUSTIFICATIVA

Os tumores de cabeça e pescoço apresentam uma alta incidência no Brasil, permanecendo como uma das neoplasias com menor tempo de sobrevida para o paciente. Os métodos atuais para o diagnóstico e tratamento desses tipos de tumores não têm se mostrado eficazes, o que torna necessários os avanços no estudo dos padrões genético-moleculares da doença.

Diversos estudos têm demonstrado alterações genéticas no braço curto do cromossomo 9 (9p) em tumores de cabeça e pescoço. Esses dados permitem a sugestão de que a região possa conter genes supressores tumorais envolvidos no início e na progressão deste tipo de câncer. Entretanto, a maioria dos estudos moleculares que analisa a região 9p é realizada com tumores de diferentes localizações anatômicas da cabeça e do pescoço, dificultando assim o estabelecimento de associações entre os achados genéticos e os parâmetros histopatológicos.

No presente estudo, o envolvimento da região cromossômica 9p foi analisado exclusivamente em carcinomas de células escamosas de cavidade bucal, após laudo histopatológico. Assim, a análise de marcadores moleculares na região em questão pode auxiliar no diagnóstico precoce das lesões, no prognóstico da doença e na avaliação dos procedimentos terapêuticos mais adequados aos pacientes com esse tipo específico de tumor.

3. OBJETIVOS

- Identificar regiões do braço curto do cromossomo 9 (9p), que sugiram a localização de genes supressores tumorais envolvidos na carcinogênese bucal.
- Correlacionar a presença de perda de heterozigose com diferentes parâmetros clínicos e histopatológicos.
- Analisar os resultados obtidos no conjunto dos dados disponíveis na literatura.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Este estudo foi realizado com amostras de sangue periférico e de tumores bucais, primários e não-tratados, de pacientes portadores de carcinoma de células escamosas.

Todas as amostras foram previamente selecionadas sob a condição dos pacientes não terem sido submetidos à radioterapia ou quimioterapia e de apresentarem heterozigose em pelo menos um dos marcadores analisados (Tabela I). Foram incluídos na amostra inicial 74 pacientes com média de idade de $59,01 \pm 10,39$ anos, sendo 66 homens e 8 mulheres. Foi obtida a confirmação, por histopatologia, da suspeita clínica de carcinoma de células escamosas bucal, de todas as amostras coletadas.

Como demonstrado na Tabela 1, dos pacientes coletados, 23 tinham tumor de língua (31,08%) e 16 de assoalho bucal (21,62%), as duas localizações anatômicas mais prevalentes desta amostra. Além disso, 5 dos pacientes apresentaram tumor de orofaringe, 7 de mucosa, 8 de palato e 6 de trígono retromolar. Alguns pacientes (n=8) possuíam tumores pertencentes a mais de uma localização anatômica, sendo 3 de língua e assoalho, 1 de mucosa e trígono, 1 de assoalho e palato, 1 de língua e trígono, 1 de língua, palato e trígono e 1 de língua, assoalho e trígono. Para um dos pacientes (55) não foi possível obter a localização anatômica exata do tumor.

Em relação à invasão de linfonodos regionais, dos 60 pacientes com informação disponível, 36 (60,0%) apresentaram os linfonodos comprometidos e 24 (40,0%) não comprometidos.

Dentre os pacientes onde foi possível obter a informação sobre o grau de diferenciação tumoral (n=56), apenas dois apresentaram tumores pouco diferenciados (grau I), 34 tumores moderadamente diferenciados (grau II) e 20 tumores bem diferenciados (grau III) (Tabela 1).

Com relação ao tratamento, observou-se que a grande maioria dos pacientes recebeu uma combinação de cirurgia e radioterapia (n=24), sendo poucos os pacientes submetidos a outras combinações de tratamento: quatro deles a quimio/radioterapia, um deles a uma combinação de cirurgia e quimioterapia e novamente um apenas recebeu uma combinação de cirurgia, quimio e radioterapia. Alguns pacientes receberam tratamento exclusivamente radioterápico (n=17), exclusivamente cirúrgico (n=11) e exclusivamente quimioterápico (n=1).

Também pudemos observar que 28 pacientes foram a óbito em decorrência do tumor, o equivalente a 43,75% da amostra quando essa informação estava disponível (64 dos 74 pacientes).

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética dos centros de coleta envolvidos (Hospital Erasto Gaertner, Hospital do Câncer de Londrina e Centro Odontológico Universitário Norte do Paraná) e, também, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Foi realizada uma entrevista com cada doador que recebeu as informações sobre os objetivos da pesquisa e o formulário para a assinatura do Consentimento Informado (Anexos), para posterior coleta do material.

A cada indivíduo foi solicitado responder a um Questionário Padrão (Anexos), também aprovado pela Comissão de Bioética da Universidade Estadual de Londrina e pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner

(Curitiba, PR), referente ao seu estilo de vida, local de nascimento, origem étnica dos pais, idade, ocupação e história familiar de câncer, entre outros, baseado naquele proposto por CARRANO e NATARAJAN (1988).

As amostras do tecido tumoral e de sangue periférico de cada paciente foram utilizadas na análise de perda de heterozigose (LOH) na região 9p como casos e controles, respectivamente.

Tabela 1. Parâmetros histopatológicos e clínicos dos pacientes portadores de carcinomas bucais

Código	Localização	Tamanho (cm)	ILR	Diferenciação	Tratamento	Óbito
1	Língua	4,5	Sim	-	Quimio/radioterapia	Sim
2	Língua	4,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
3	Trígono retromolar	4,0	Sim	-	Radioterapia	Sim
4	Trígono retromolar	3,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
5	Mucosa e trígono	6,0	Não	-	Radioterapia	Sim
6	Língua	5,0	Sim	Grau III	Radioterapia	Sim
7	Mucosa	7,0	Sim	-	Quimioterapia	Sim
8	Língua	4,0	Não	-	Cirúrgico/radioterapia	Não
9	Assoalho	4,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
10	Língua	1,5	Sim	-	Cirúrgico	Sim
11	Língua e Assoalho	3,0	Não	-	Cirúrgico	Não
12	Trígono retromolar	2,5	Sim	-	Cirúrgico	Não
13	Orofaringe	4,0	Sim	-	Radioterapia	Sim
14	Orofaringe	3,0	Sim	Grau III	-	Não
15	Língua	3,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
16	Mucosa	3,0	Sim	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Não
17	Língua	4,5	Sim	Grau III	Radioterapia	Sim
18	Palato	4,0	Não	Grau II	Radioterapia	Não
19	Trígono	2,0	-	Grau II	-	Não

	retromolar					
20	Palato	-	Não	Grau III	Cirúrgico	Não
21	Palato	3,0	Não	Grau III	Radioterapia	Não
22	Assoalho e palato	3,5	Sim	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Sim
23	Palato	6,0	Sim	Grau III	Químico/radioterapia	Não
24	Assoalho	1,5	-	Grau II	-	Não
25	Mucosa	2,5	Não	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
26	Assoalho	1,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
27	Língua	4,0	Sim	Grau III	-	Sim
28	Palato	3,0	Não	-	Cirúrgico	Não
29	Orofaringe	7,0	Não	-	Químico/radioterapia	Não
30	Palato	8,4	Sim	-	Cirúrgico/radioterapia	Não
31	Língua	7,0	N.A.	-	Radioterapia	Sim
32	Assoalho	1,2	Não	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Não
33	Língua	2,0	Não	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
34	Língua	2,0	Não	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
35	Palato	2,0	Sim	Grau II	Quimioterapia	Sim
36	Língua	3,0	Não	-	Cirúrgico/radioterapia	Não
37	Mucosa	2,0	N.A.	Grau II	Radioterapia	Sim
38	Língua	1,5	Não	Grau II	Cirúrgico	Não
39	Assoalho	3,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
40	Assoalho	3,0	N.A.	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
41	Língua e Assoalho	-	-	Grau II	-	
42	Língua	-	Sim	Grau II	Radioterapia	Sim
43	Língua e trígono	6,5	Sim	Grau II	Radioterapia	Sim
44	Língua	2,0	Sim	Grau II	Radioterapia	Sim
45	Língua, palato e trígono	4,5	Não	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Não
46	Assoalho	4,5	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Sim
47	Assoalho	4,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radio/químico	Não
48	Assoalho	5,0	Sim	Grau II	Radioterapia	Sim
49	Trígono	-	-	Grau II	-	-

	retromolar					
50	Assoalho	2,0	Sim	Grau II	-	Não
51	Assoalho	2,5	Sim	Grau II	-	Não
52	Assoalho	3,0	Não	Grau II	Radioterapia	Não
53	Orofaringe	1,5	Não	Grau I	Cirúrgico/radioterapia	Sim
54	Assoalho e língua	1,0	Não	Grau II	Radioterapia	Não
55	-	6,0	Sim	Grau III	Químio/radioterapia	Sim
56	Assoalho	3,0	Não	Grau III	Cirúrgico	Sim
57	Língua	4,0	Não	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
58	Língua	-	-	-	-	-
59	Trígono retromolar	5,0	-	Grau II	-	-
60	Mucosa	3,0	Não	Grau III	Cirúrgico	Não
61	Língua	5,0	-	Grau III	-	-
62	Palato	-	-	-	-	-
63	Língua	-	Não	Grau III	Cirúrgico/quimioterapia	Não
64	Língua, assoalho e trígono	-	-	-	-	-
65	Língua	2,0	Não	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Não
66	Assoalho	3,0	Sim	Grau II	Cirúrgico/radioterapia	Não
67	Língua	1,0	-	Grau III	Cirúrgico	-
68	Assoalho	-	Sim	Grau I	Cirúrgico/radioterapia	Não
69	Língua	-	-	-	-	-
70	Assoalho	3,0	Sim	Grau II	Cirúrgico	Não
71	Mucosa	3,0	Não	Grau III	Cirúrgico/radioterapia	Sim
72	Língua	-	Sim	Grau II	Cirúrgico	-
73	Mucosa	4,0	Sim	Grau II	Radioterapia	Sim
74	Mucosa	2,5	Sim	Grau III	Radioterapia	Não

Legenda: ILR: invasão de linfonodos regionais; N.A.: não avaliáveis; Grau I: pouco diferenciado; Grau II: moderadamente diferenciado; Grau III: bem diferenciado.

4.2 COLETAS DO SANGUE PERIFÉRICO E DO TECIDO TUMORAL

As coletas de sangue foram realizadas através de punção intravenosa com agulhas e seringas descartáveis estéreis. De cada indivíduo foram coletados cerca de 10 mL de sangue periférico, os quais foram imediatamente colocados em tubos estéreis contendo 1,75 mL de solução anticoagulante ACD (0,016M de ácido cítrico; 0,068M de citrato de sódio; 0,081M de glicose, previamente autoclavados), rotulados e mantidos a 4°C até o processamento.

As amostras do tecido tumoral foram coletadas pelo médico responsável, que encaminhou um fragmento para a análise histopatológica para confirmar a presença de malignidade e outro fragmento era destinado ao nosso estudo. Estes eram colocados em frascos estéreis e estocados em condições ideais de temperatura e conservação (-80°C) para posterior extração do DNA.

A análise histopatológica foi realizada com coloração HE de rotina, para confirmação das suspeitas clínicas. A classificação histopatológica dos tumores foi realizada de acordo com os critérios internacionais estabelecidos pela Classificação Internacional de Tumores (WHO). O estadiamento clínico foi determinado de acordo com o estadiamento TNM do câncer.

4.3 - EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE AMOSTRAS DE SANGUE PERIFÉRICO

O método para o isolamento do DNA foi escolhido com a finalidade de originar DNA de alto peso molecular e consiste, basicamente, no rompimento

mecânico e/ou enzimático dos tecidos, extração das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes químicos e precipitação do DNA com etanol.

O DNA genômico foi extraído pelo método *salting out* segundo BIGNON e FERNANDEZ-VIÑA (1997), com modificações. Cerca de 10 mL de sangue periférico foram centrifugados com tampão de lise para células vermelhas RCLB 1X (obtido da solução estoque 10X concentrada: 12,1 g de Tris; 110,2g de MgCl₂; 5,8 g de NaCl e água destilada) a 13000 rpm por 2 minutos. Este processo foi repetido até a obtenção de um botão de glóbulos brancos que foi incubado a 60° C por 40 minutos, juntamente com 80 µl de tampão proteinase K 5X, 40 µl de uma solução de proteinase K (10 mg/mL), 20 µl de SDS 20% e 240 µl de água ultrapura. Em seguida, foi adicionado NaCl para a precipitação protéica, aproveitando-se somente o sobrenadante, onde está o DNA. Após nova centrifugação, foi realizada a precipitação do DNA com a adição de etanol. Ao final do processo, a amostra de DNA foi ressuspensa em 50 µl de água ultrapura e armazenada a -20° C até o momento da amplificação por PCR.

4.4 - EXTRAÇÃO DO DNA DE AMOSTRAS DE TECIDO TUMORAL

O tecido tumoral foi descongelado e posteriormente fragmentado com o auxílio de tesouras, pinças e bisturis estéreis. Para a obtenção de DNA de alto peso molecular, foi seguido o protocolo de extração manual pelo método de Fenol-Clorofórmio.

Foram adicionados a um tubo de microcentrífuga os fragmentos do tecido tumoral, 80µL de tampão da proteinase K 5X, 40µL de proteinase K (10mg/mL), 20µL de SDS 20% e 240µL de água ultrapura e esse conjunto foi homogeneizado em agitador tipo Vortex. Em seguida, o tubo foi incubado no bloco de aquecimento a 60°C por 30 minutos, deixando-se atingir a temperatura ambiente antes de prosseguir com a metodologia. Foram adicionados na seqüência 500 µL de fenol saturado pH 8,0 e 400 µL de clorofórmio, homogeneizando manualmente várias vezes. Após isso, o tubo foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Na seqüência foram adicionados a ele 50 µL de acetato de sódio 3M e 1 mL de etanol absoluto para a precipitação do DNA. Caso precipitasse pouco DNA, a amostra era incubada a -20°C por uma hora. Esse novo tubo era centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, foram adicionados 500 µL de etanol 70% e o tubo foi invertido gentilmente várias vezes, para lavar o DNA, antes de uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o tubo colocado em bloco de aquecimento a 55°C por 10 minutos para que o DNA secasse.

Após esse tempo, a amostra de DNA foi ressuspensa em 30 a 50 µL de água ultrapura e retornou ao bloco de aquecimento a 95°C por 10 minutos, para que a solução de DNA ficasse homogênea. Após atingir a temperatura ambiente, a amostra de DNA foi armazenada a -20°C.

4.5 - QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA

Para a quantificação das amostras de DNA, foi utilizado o espectrofotômetro *Gene Quant pro (RNA/DNA calculator)*. A leitura para quantificação e pureza é procedida em comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros (nm). Para uma amostra de DNA ser considerada pura, a razão da densidade óptica OD_{260}/OD_{280} deverá estar entre 1,6 e 1,8. Após a leitura, obtém-se a razão entre as absorvâncias e subseqüentemente a concentração de DNA em $\mu\text{g/ml}$.

4.6 - AMPLIFICAÇÃO DO DNA - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática “in vitro” de várias cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase. Esta reação se baseia no pareamento e extensão enzimática de um par de oligonucleotídeos (moléculas de DNA fita simples), usados como iniciadores que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla, alvo da amplificação. Estes iniciadores são sintetizados quimicamente, de maneira que suas seqüências de nucleotídeos são complementares às seqüências específicas que flanqueiam a região alvo. Um ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, pareamento e extensão. A desnaturação consiste na separação das fitas duplas de DNA, através de uma elevação da temperatura para 92° a 95° C. Na etapa de pareamento, a temperatura é rapidamente reduzida para cerca de 55° C, dependendo do tamanho e da seqüência do iniciador utilizado, o que irá permitir a hibridação DNA-

DNA de cada iniciador com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo. Em seguida a temperatura é elevada para 72° C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão, envolvendo a adição de nucleotídeos e utilizando como molde a seqüência - alvo, de maneira que se realize uma cópia desta (FERREIRA e GUATTAPAGLIA, 1998).

Neste trabalho, a técnica de PCR foi utilizada para a amplificação dos marcadores de microssatélites em regiões específicas do braço curto do cromossomo 9. Foram utilizados iniciadores específicos marcados com fluorescência para os marcadores de microssatélites do cromossomo 9. Informações sobre a localização, tamanho do fragmento, freqüência de heterozigidade e o fluorocromo utilizado para cada marcador de microssatélite deste estudo encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Marcadores microssatélites utilizados

Marcador	Localização	Heterozigose (Genome Database)	Fluorocromo
D9S171	9p21	0,8043	6-FAM
D9S200	9p21	0,8300	HEX
D9S1748	9p21	0,8700	HEX
D9S169	9p21	0,8386	6-FAM
D9S1749	9p21	0,9400	6-FAM
D9S157	9p22-9p23	0,8494	HEX

Testes de padronização foram realizados com iniciadores não marcados antes da amplificação com os iniciadores marcados. Todos os produtos de

amplificação foram obtidos utilizando as mesmas condições, conforme descrito na seqüência.

10 μ L de volume de reação contendo:

- 1) 160 ng de DNA molde
- 2) 5 μ M de cada iniciador
- 3) 1250 μ M de cada desoxinucleotídeo trifosfatado
- 4) 1 μ L de tampão de reação
- 5) 15mM de $MgCl_2$
- 6) 1U de DNA Taq polimerase Platinum
- 7) Água ultrapura para completar o volume final.

As amplificações foram realizadas em ciclos como se segue: 96 C° por 5 min; 30 ciclos de 96 C° por 20 segundos, 55 C° por 30 segundos e 72 C° por 40 segundos; 72 C° por 20 min, usando termociclador *Eppendorf Mastercycle Gradient*.

Os produtos de PCR foram primeiramente analisados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo para avaliar a presença e especificidade do produto amplificado para cada marcador, bem como a intensidade da banda.

Em seguida, reações de PCR foram realizadas utilizando-se os iniciadores marcados com fluorocromo para a posterior análise pelo *Software*, uma vez que os seqüenciadores de DNA automatizados possuem um sistema de detecção para marcadores fluorescentes e têm permitido a detecção de repetições de dinucleotídeos para a determinação da perda alélica (CAWKWELL et al., 1993).

Inicialmente, cada microssatélite foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR), nas mesmas condições apresentadas anteriormente, também com o termociclador *Eppendorf Mastercycle Gradient*.

Após a amplificação por PCR, o número das amostras e as condições de corrida foram passadas ao computador para a posterior análise. Em seguida, a placa de injeção contendo as amostras foi montada. Para isso, preparou-se primeiramente o *Mix Loading Solution*, uma solução contendo 999 μL de água ultrapura e 1 μL de TWEEN 20, com uma pequena centrifugação antes de prosseguir. Desta solução foram selecionados 785,4 μL e passados para outro tubo de microcentrífuga. Neste último foram adicionados 30,6 μL do marcador molecular e centrifugado. Na seqüência, 98 μL da solução foram acondicionados na fileira 1 da placa de injeção e 8 μL distribuídos nos demais poços, completando-se com 2 μL do produto de PCR, totalizando 10 μL por poço.

As amostras contidas na placa foram então desnaturadas a 94°C por 3 minutos e acondicionadas no gelo para que não renaturassem. Após uma pré-corrida, a placa era então levada ao seqüenciador *MEGABACE 1000* previamente programado para genotipagem.

As condições de corrida foram: injeção a 3KV por 80 segundos e corrida a 8KV por 80 minutos. Após a eletroforese na presença do marcador padrão ET-ROX 400 (*Amershan Biosciences*), os produtos de PCR foram detectados e analisados pelo *Software Fragment Profiler 2.1* (*Amershan Biosciences*).

4.7 - ANÁLISE DE PERDA DE HETEROZIGOSE (LOH)

Primeiramente foram analisados, para os marcadores microssatélites polimórficos do cromossomo 9 (Tabela 2), o DNA obtido do sangue periférico de cada paciente para a identificação de alelos informativos (presença de alelos que apresentem uma diferença de tamanho superior ou igual a 4pb, conforme SHEN et al., 2000). Os marcadores que se mostraram informativos para cada paciente foram, em seguida, avaliados quanto à perda de heterozigose (diferença de tamanho ou ausência de um dos alelos no tecido tumoral quando comparado ao DNA normal) no tecido tumoral. As amostras cujos marcadores apresentaram-se homozigotos na análise do sangue periférico foram consideradas não informativas para aquele marcador específico.

Os iniciadores diretos de cada par estavam marcados com um dos dois fluorocromos (HEX ou 6-FAM). Os tamanhos alélicos e a avaliação da perda de heterozigose foram determinados pela separação dos produtos de PCR

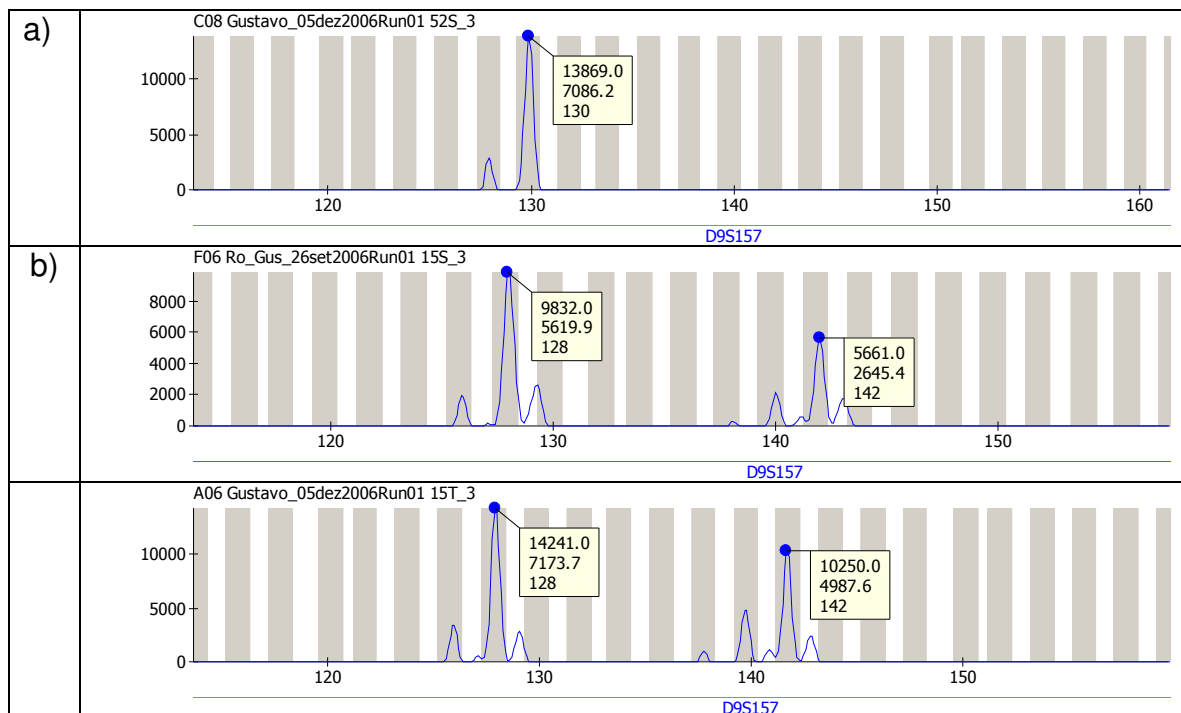
A análise de LOH foi realizada através das alturas dos picos obtidos no seqüenciador, obedecendo-se a seguinte relação matemática:

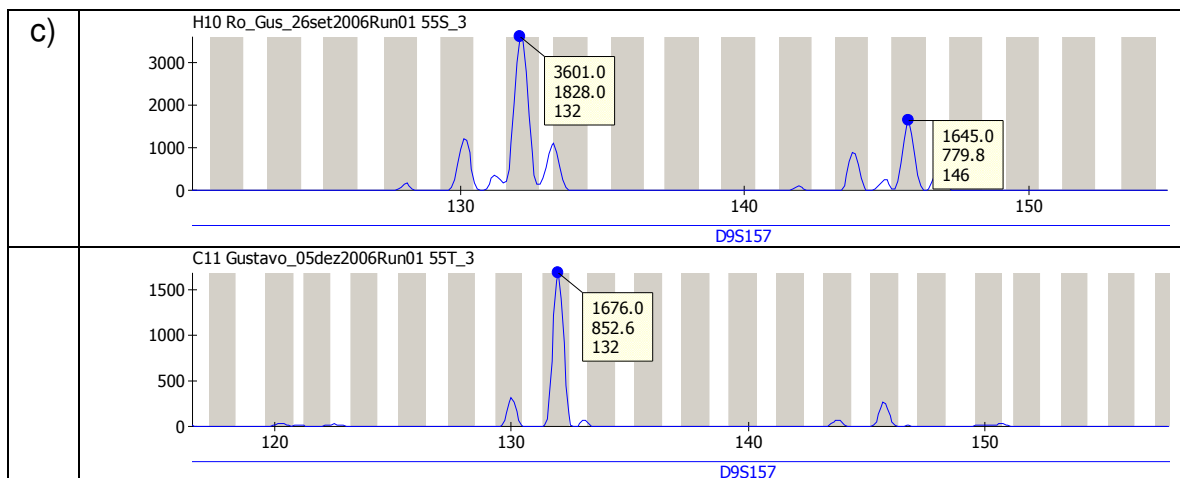
$$\text{LOH} = \frac{\frac{\text{Altura do pico do alelo normal 2}}{\text{Altura do pico do alelo normal 1}}}{\frac{\text{Altura do pico do alelo tumoral 2}}{\text{Altura do pico do alelo tumoral 1}}}$$

Sendo o alelo 1 aquele que possui menor tamanho em pares de bases, e o alelo 2 aquele que possui maior tamanho em pares de bases, um valor de LOH $\leq 0,6$ indica que a amostra tumoral apresenta significativa perda do alelo de maior tamanho, enquanto que um valor de LOH $\geq 1,6$ indica que a amostra tumoral apresenta perda do alelo de menor tamanho.

Resultados duvidosos levaram a repetição ou exclusão das amostras. Todos os cálculos de perdas de heterozigose foram confirmados utilizando-se adicionalmente os valores das áreas dos picos dos alelos como parâmetro adicional em novo cálculo. Foram consideradas como tendo LOH apenas as amostras com valores inclusivos em ambos os cálculos realizados (Figura 1).

Figura 1: Exemplos da análise no *Software Fragment Profiler*





Legenda: a) Amostra de um homocigoto (não informativo); b) Amostra de um heterocigoto em que não houve perda alélica no tumor; c) Amostra de um heterocigoto em que houve perda de heterocigose no tumor.

4.8 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste do Qui-quadrado (χ^2) e a análise de variância foram aplicados com o objetivo de verificar se as perdas de heterocigose encontradas nas regiões do cromossomo 9 analisadas estão relacionadas estatisticamente com o início e progressão dos tumores de cavidade bucal, conforme as fórmulas apresentadas por BEIGUELMAN (1988).

O teste do Qui Quadrado foi utilizado na comparação entre os parâmetros histopatológicos (invasão de linfonodos regionais e grau de diferenciação do tumor) e clínico (óbito) e a LOH observada nos marcadores microssatélites. O teste foi realizado em tabelas de contingência 2X2, para se obter o valor do P. O valor de $P=0,05$ foi adotado como limite de significância.

A análise de variância foi realizada para comparar as médias dos tamanhos dos tumores com os resultados obtidos das perdas de heterocigose.

5. RESULTADOS

A maior parte da amostra de pacientes analisada foi constituída de indivíduos tabagistas. Destes, foi observado que 43,24% (n=32) tinham o hábito de consumir cigarro de palha, cachimbo ou mascar fumo, associados ou não ao cigarro comum. O consumo de cigarro de palha foi o hábito mais observado, estando presente em 28 destes 32 pacientes. Além destes, um paciente fumava cachimbo e outros dois consumiam fumo de mascar juntamente com o cigarro de palha. Com relação ao hábito da ingestão de bebidas alcoólicas, 58 pacientes (78,38%) consideraram-se consumidores freqüentes. Dentre estes, 28 (48,27%) disseram ser consumidores somente de destilados, quatro (6,89%) somente de não-destilados e 26 (44,83%) de ambos os tipos de bebidas alcoólicas (destiladas e não destiladas).

Além destes parâmetros, 39,19% dos pacientes (n=29) afirmaram ingerir alimentos ou bebidas muito quentes, como chimarrão e café.

Quanto ao histórico familiar de câncer, aproximadamente 40% (n=30) dos pacientes disseram possuir pessoas aparentadas com histórico de câncer, sendo os tipos mais prevalentes os de cabeça e pescoço ou os relacionados ao trato digestivo inferior.

5.1 - MARCADORES MICROSSATÉLITES POLIMÓRFICOS EM 9p

Foram analisados seis marcadores microssatélites polimórficos em 9p (D9S157, D9S169, D9S200, D9S1748, D9S1749, D9S171) em amostras de DNA tumoral e de sangue periférico de 74 pacientes (Tabela 3).

Como apresentado na Tabela 3, o número de marcadores microssatélites analisados variou para cada paciente, em decorrência de ausência de amplificação pela PCR de alguns marcadores e da escassez de DNA tumoral para a realização de todas as reações, especialmente para os últimos locos analisados.

As freqüências de heterozigotos da amostra em todos os seis marcadores ficaram abaixo das descritas pelo "Genome Database - GDB" (<http://www.gdb.org>) (Tabela 4). Mesmo com essa discordância, a amostra se mostrou informativa pela presença de LOH em todos os marcadores.

As freqüências de LOH encontradas nos casos informativos para cada um dos seis marcadores analisados estão descritas na Tabela 4. Em todos os locos analisados foram encontradas freqüências de perdas de heterozigose, variando de 21,31% a 34,00% (Tabela 4).

Dos seis marcadores analisados, três (D9S157, D9S200 e D9S169) mostraram freqüências de LOH superiores a 30%. O marcador D9S1749 foi o que apresentou a menor freqüência de LOH (21,31%) (Tabela 4). A análise da freqüência de LOH em locos combinados também mostrou uma alta freqüência de perda alélica, sendo: 42 pacientes (56,75%) apresentaram LOH em pelo menos um dos locos; 20 pacientes (27,02%) tiveram LOH em pelo menos 2 dos locos; 9 pacientes (12,16%) tiveram LOH em pelo menos 3 dos locos e 5 pacientes (8%) tiveram LOH em 4 locos. Nenhum paciente apresentou LOH em todos os locos possíveis de serem analisados.

As freqüências de LOH foram avaliadas em relação aos diferentes sítios anatômicos dos tumores e observou-se que: dos 23 pacientes com tumores exclusivamente de língua que puderam ser avaliados com relação à presença de

perdas alélicas, 12 deles (52,17%) apresentaram perda em pelo menos um dos locos analisados; dentre os 16 pacientes com tumores exclusivamente de assoalho bucal, 9 (56,25%) apresentaram LOH em pelo menos um dos locos; dentre os 5 pacientes com tumores de orofaringe, todos eles (100%) apresentaram LOH em apenas um dos locos analisados; dentre os 7 pacientes com tumores exclusivamente de mucosa, 5 (71,43%) apresentaram LOH em pelo menos um dos locos; dos 8 pacientes com tumores exclusivamente de palato, 4 (57,14%) apresentaram LOH em pelo menos um dos locos e dos 6 pacientes com tumores exclusivamente de trígono retromolar, 5 (83,33%) apresentaram LOH em pelo menos um dos locos analisados.

Tabela 3. Distribuição de homozigotos, heterozigotos, LOHs e casos não amplificados nos seis marcadores microssatélites analisados nas amostras de tumores dos pacientes portadores de carcinomas bucais.

AMOSTRA	D9S157	D9S200	D9S1748	D9S1749	D9S171	D9S169
CB 01	LOH	LOH	LOH	HET	HOMOZIG	LOH
CB 03	HET.	HOMOZIG	HOMO	LOH	HET	HET
CB 05	LOH	HET	HET	HOMOZIG	HOMOZIG	HET
CB 07	LOH	HOMOZIG	HOMOZIG	LOH	LOH	LOH
CB 10	HET	LOH	LOH	LOH	HOMOZIG	HOMOZIG
CB 11	HOMOZIG	HET	LOH	LOH	LOH	LOH
CB 12	HOMOZIG	HET	HET	HET	HOMOZIG	LOH
CB 14	HET	HOMOZIG	HOMOZIG	HET	HET	HET
CB 15	HET	HET	HOMOZIG	HET	LOH	HOMOZIG
CB 16	HOMOZIG	LOH	HOMOZIG	HET	HET	HET
CB 17	HET	HOMOZIG	HET	HET	HET	HET
CB 19	HOMOZIG	LOH	HOMOZIG	HET	HET	LOH
CB 21	HOMOZIG	HET	HET	LOH	HET	HOMOZIG
CB 22	HET	HET	LOH	HOMOZIG	HET	HOMOZIG
CB 23	HET	HET	HOMOZIG	HOMOZIG	HOMOZIG	HOMOZIG
CB 24	HET	LOH	HOMOZIG	LOH	HOMOZIG	HET
CB 25	HET	HET	HOMOZIG	HET	HET	HET
CB 26	LOH	HET	-----	HET	-----	-----
CB 28	HOMOZIG	HOMOZIG	HET	LOH	HET	-----
CB 29	HET	LOH	-----	HET	HOMOZIG	HOMOZIG
CB 30	HOMOZIG	HET	HOMOZIG	HOMOZIG	HET	HET
CB 31	HET	LOH	HET	LOH	LOH	LOH

CB 32	LOH	LOH	HOMOZIG	HET	LOH	LOH
CB 33	HOMOZIG	HET	HET	HET	HOMOZIG	HOMOZIG
CB 34	HET	HOMOZIG	HET	HET	HET	HOMOZIG
CB 35	HOMOZIG	LOH	HOMOZIG	HET	LOH	LOH
CB 36	HOMOZIG	HET	HET	HET	HOMOZIG	HOMOZIG
CB 38	HET	HET	HET	HET	HOMOZIG	HET
CB 39	LOH	HET	HET	HET	HET	HOMOZIG
CB 40	HET	HOMOZIG	HET	HET	HET	HET
CB 41	HOMOZIG	LOH	HOMOZIG	HET	HET	LOH
CB 43	LOH	HOMOZIG	-----	LOH	-----	-----
CB 47	HET	LOH	HOMOZIG	HET	HET	LOH
CB 49	LOH	HOMOZIG	HOMOZIG	HET	HET	HET
CB 52	HOMOZIG	HET	HET	HOMOZIG	HET	HET
CB 54	LOH	LOH	HOMOZIG	HET	LOH	HOMOZIG
CB 55	LOH	HET	HOMOZIG	HET	HOMOZIG	HOMOZIG
CB 58	HOMOZIG	HET	HOMOZIG	HOMOZIG	-----	-----
CB 61	HOMOZIG	LOH	HET	HET	HET	HET
CB 62	HET	HET	LOH	HET	LOH	HOMOZIG
CB 63	HET	HET	HOMOZIG	HET	HOMOZIG	HET
CB 64	LOH	HOMOZIG	HET	LOH	HET	HOMOZIG
CB 65	HET	HET	HOMOZIG	HOMOZIG	HET	HOMOZIG
CB 67	HOMOZIG	HOMOZIG	HET	HET	HET	HOMOZIG
CB 68	HET	HET	HET	HET	HOMOZIG	HET
CB 69	LOH	HET	HET	HET	HOMOZIG	HET
CB 70	HOMOZIG	HET	HOMOZIG	HET	HOMOZIG	HOMOZIG
CB 71	-----	LOH	-----	HET	-----	LOH
CB 73	HET	HET	HOMOZIG	HET	HOMOZIG	HOMOZIG
CB 74	HET	HET	HET	HET	HET	HOMOZIG
CB 75	LOH	HET	HOMOZIG	HOMOZIG	HOMOZIG	HOMOZIG
CB 76	-----	HOMOZIG	LOH	HOMOZIG	HET	-----
CB 77	-----	-----	LOH	HOMOZIG	HET	HOMOZIG
CB 79	LOH	-----	HOMOZIG	HET	HOMOZIG	HET
CB 82	-----	-----	-----	HET	-----	-----
CB 83	HOMOZIG	-----	-----	HET	-----	-----
CB 84	HET	HOMOZIG	HET	HOMOZIG	HET	HET
18CO	HET	HET	HOMOZIG	HET	LOH	LOH
22CO	HET	LOH	LOH	HET	HOMOZIG	HET
23CO	HET	LOH	HET	HET	HOMOZIG	HOMOZIG
24CO	HOMOZIG	HOMOZIG	HET	HET	HET	HET
28CO	LOH	HET	HOMOZIG	LOH	HOMOZIG	HOMOZIG
32CO	LOH	HET	HET	HET	HET	HET
35CO	HET	-----	HOMOZIG	HET	HOMOZIG	-----
38CO	HET	HOMOZIG	-----	HOMOZIG	-----	-----
41CO	HET	HOMOZIG	HET	HET	HOMOZIG	HET
43CO	HET	-----	-----	HET	HOMOZIG	-----
45CO	HET	-----	HOMOZIG	LOH	HET	HET
47CO	HET	HET	HOMOZIG	HET	HET	HET
49CO	HET	HET	HOMOZIG	HET	HET	HET
50CO	HOMOZIG	HET	HET	HOMOZIG	HET	HOMOZIG

52CO	LOH	LOH	LOH	LOH	HOMOZIG	HET
53CO	HET	HET	-----	HET	-----	HET
55CO	-----	-----	LOH	HET	-----	-----
N total	69	66	65	74	65	63

Legenda: HOMOZIG= homozigoto; HET=heterozigoto; LOH= perda de heterozigose; - = ausência de resultado.

Tabela 4. Freqüências de Heterozigose e das perdas de Heterozigose obtidas nos seis marcadores microssatélites em 9p

Marcador microssatélite em 9p	Pacientes analisados (N)	Heterozigose (amostra) (%)	Heterozigose (GDB) (%)	LOHs obtidas (%)
1. D9S157	69	72,46	84,94	34,00
2. D9S200	66	75,75	83	34,00
3. D9S1748	65	53,85	87	28,57
4. D9S1749	74	82,43	94	21,31
5. D9S171	65	61,54	80,43	22,50
6. D9S169	63	61,90	83,86	30,77

Legenda: GDB: Genome Data Base; LOHs: perdas de heterozigose.

5.2 - ANÁLISE DE PARÂMETROS HISTOPATOLÓGICOS E CLÍNICO

Foi realizada a análise entre os parâmetros histopatológicos (tamanho do tumor, invasão de linfonodos regionais e grau de diferenciação do tumor) e clínico (óbito) dos pacientes e a presença ou ausência de LOH. Foram incluídos somente os pacientes que possuíam a informação referente ao parâmetro em questão com material em condição de ser amplificado para o marcador microssatélite, o que determinou uma variação do número amostral (Tabelas 5, 6, 7, 8 e 9).

A Tabela 5 apresenta as médias dos tamanhos dos tumores dos pacientes com e sem LOH para os seis marcadores analisados. A análise da variância, aplicada às informações desta tabela, não demonstrou diferenças estatisticamente

significativas (Tabela 6). O teste de Bartlett, para avaliar a homogeneidade das variâncias, apresentou um valor não significativo, igual a: $\chi^2_{(11)corr.} = 4,09$; $P > 0,95$.

Tabela 5. Médias dos tamanhos dos tumores e número de pacientes com e sem LOH para os seis marcadores microssatélites em 9p

Marcador	Médias e desvios		Número de pacientes	
	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH
	X ± DP	X ± DP		
D9S157	3,44±1,79	3,65±1,55	13	26
D9S200	3,73±1,77	3,68±1,48	15	27
D9S1748	3,72±1,46	3,73±1,76	9	23
D9S1749	3,52±1,46	3,63±1,79	9	41
D9S171	3,56±1,50	3,44±1,86	8	28
D9S169	4,23±2,00	3,61±1,53	11	22

Legenda: LOH: perda de heterozigose.

Tabela 6. Análise da variância para a comparação das médias dos tamanhos dos tumores dos pacientes com e sem LOH nos seis marcadores microssatélites em 9p

Varição	G.L.	SQ	S ² X	F	G.L.	P
Entre com e sem LOH	1	0,33	0,33	0,12	1;220	P>0,05
Entre marcadores	5	2,67	0,53	0,18	5;220	P>0,05
Interação	5	3,06	0,61	0,21	5;220	P>0,05
E.T.G.	11	6,06	0,55	0,19	13;220	P>0,05
Resíduo	220	628,25	2,86			
Total	231	634,31				

Legenda: LOH: perda de heterozigose.

O número de pacientes com e sem LOH que tinham grau II ou III de diferenciação tumoral e que foram a óbito apresentou-se homogeneamente distribuído tanto quando cada marcador foi analisado isoladamente como quando os resultados foram analisados em conjunto (grau de diferenciação tumoral: $\chi^2_1 =$

0,476; $P > 0,30$ e óbito: $\chi^2_{1=1,36}$; $P > 0,20$), como podemos observar nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Número de pacientes com e sem LOH e com graus II e III de diferenciação tumoral nos seis marcadores analisados e resultados do teste do χ^2 de homogeneidade

	D9S157		D9S200		D9S1748		D9S1749		D9S171		D9S169		TOTAL	
	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH
Grau II	9	15	6	17	4	11	5	22	4	14	4	13	32	92
Grau III	3	9	5	8	3	7	4	12	3	6	3	6	21	48
Qui quadrado	$\chi^2_{1=0,563}$		$\chi^2_{1=0,601}$		$\chi^2_{1=0,034}$		$\chi^2_{1=0,254}$		$\chi^2_{1=0,389}$		$\chi^2_{1=0,289}$		$\chi^2_{1=0,476}$	
	$P > 0,30$		$P > 0,30$		$P > 0,80$		$P > 0,50$		$P > 0,50$		$P > 0,50$		$P > 0,30$	

Legenda: LOH: perda de heterozigose

Tabela 8. Número de pacientes com e sem LOH e com e sem ocorrência de óbito nos seis marcadores analisados e resultados do teste do χ^2 de homogeneidade

	D9S157		D9S200		D9S1748		D9S1749		D9S171		D9S169		TOTAL	
	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH
Com óbito	5	9	8	14	5	11	6	16	3	12	7	8	34	70
Sem óbito	10	17	7	14	3	13	5	24	5	16	4	14	34	98
Qui quadrado	$\chi^2_{1=0,007}$		$\chi^2_{1=0,045}$		$\chi^2_{1=0,667}$		$\chi^2_{1=0,74}$		$\chi^2_{1=0,07}$		$\chi^2_{1=2,20}$		$\chi^2_{1=1,36}$	
	$P > 0,90$		$P > 0,80$		$P > 0,30$		$P > 0,30$		$P > 0,70$		$P > 0,10$		$P > 0,20$	

Legenda: LOH: perda de heterozigose

A mesma análise para o parâmetro invasão de linfonodos regionais se mostrou estatisticamente significativa para a análise conjunta dos dados dos seis

marcadores analisados (Tabela 9), indicando que o número de pacientes com e sem LOH e com e sem invasão de linfonodos regionais não se distribuem igualmente.

Tabela 9. Número de pacientes com e sem LOH e com e sem invasão de linfonodos regionais nos seis marcadores analisados e resultados do teste do χ^2 de homogeneidade

	D9S157		D9S200		D9S1748		D9S1749		D9S171		D9S169		TOTAL	
	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH	Com LOH	Sem LOH
Com ILR	8	13	10	17	5	12	9	20	6	14	9	13	47	89
Sem ILR	7	12	5	8	3	10	2	16	1	12	1	10	19	68
Qui quadrado	$\chi^2_{1}=0,006$ P>0,90		$\chi^2_{1}=0,008$ P>0,90		$\chi^2_{1}=0,152$ P>0,50		$\chi^2_{1}=2,456$ P>0,10		$\chi^2_{1}=2,349$ P>0,10		$\chi^2_{1}=3,512$ P>0,05		$\chi^2_{1}=4,121$ P<0,05	

Legenda: ILR: invasão de linfonodos regionais; LOH: perda de heterozigose.

6. DISCUSSÃO

O carcinoma de células escamosas se constitui na neoplasia de cabeça e pescoço mais comum, registrando um tempo de vida livre de doença reduzido. Além disso, apresenta grande morbidade devido aos defeitos de face decorrentes dos procedimentos cirúrgicos e radioterápicos (RAI et al., 2004). Apesar de sua importância, em comparação a outras neoplasias humanas, pouco se conhece sobre as bases moleculares de seu desenvolvimento e ainda não foram descritos marcadores genéticos bem definidos que contribuam na determinação do prognóstico e na melhoria da conduta terapêutica.

Perdas de heterozigose (LOH) têm sido relatadas em muitos tipos de cânceres, incluindo os carcinomas de cabeça e pescoço, uma vez que deleções somáticas envolvendo regiões cromossômicas específicas podem estar associadas à inativação alélica de um gene supressor tumoral (REIS et al., 2002; BALDWIN et al., 2005; NUMASAWA et al., 2005). Considerando-se que na carcinogênese de boca, muitos genes supressores de tumor podem não ter sido determinados até o momento, a identificação de regiões com LOH pode contribuir para o mapeamento dos mesmos (ARAI et al., 2001). Além disso, de acordo com PEREZ-ORDOÑEZ et al. (2006), a análise de LOH, conjuntamente com outros marcadores, pode ser um importante fator na predição de risco de progressão tumoral quando se avalia lesões pré-cancerosas, desenvolvimento de tumores secundários e óbito.

Muitas regiões genômicas vêm sendo estudadas nos carcinomas bucais e relacionadas a possíveis locos de genes envolvidos com o processo tumoral.

YAMAMOTO et al. (2001) sugerem o envolvimento do cromossomo 21 (21q) nestas neoplasias, afirmando que a avaliação de LOH nesta região pode ser um marcador útil na determinação do potencial de recorrência tumoral. REIS et al. (2002) sugerem que o cromossomo 22 (22q) possa conter genes supressores específicos para diferentes localizações anatômicas dos tumores de cabeça e pescoço, incluindo a região bucal, e que alterações nestas regiões poderiam ter uma relevância clínica e prognóstica. NUMASAWA et al. (2005) acreditam que a frequência de LOH por eles observada em 2q indica a presença de genes candidatos a supressores tumorais em 2q14-21 e 2q36, dados que corroboram os de YAMAMOTO et al. (2003).

Diversos estudos têm considerado a região 9p como um ponto de deleções freqüentes em diferentes tipos de tumores, inclusive nos de cabeça e pescoço, por apresentar alta freqüência de perdas de heterozigose. Segundo VAN DER RIET et al. (1994) e ROSIN et al. (2000), LOH em 9p pode ser um evento inicial em neoplasias escamosas de cabeça e pescoço, sendo observada inclusive em lesões pré-neoplásicas. Mais especificamente, a região cromossômica 9p21 está envolvida em inversões cromossômicas, translocações, perdas de heterozigose e deleções em uma variedade de tipos de tumores como gliomas, tumores de pulmão, leucemias e melanomas. Deleções em marcadores de microssatélite em 9p21 são encontradas em mais da metade dos melanomas. Estes resultados sugerem que a região 9p21 contém um ou mais genes supressores de tumor que devem estar envolvidos na gênese de diversos tipos de tumores (KAMB et.al., 1994; NOBORI et. al., 1994). Um destes genes foi mapeado por SHAN et.al. (2004). Estes autores mapearam o gene *TUSC1* (Tumor Suppressor Candidate 1)

próximo ao marcador microssatélite D9S126, em uma região que está frequentemente deletada em carcinomas de pulmão, no cromossomo 9p21.

Dados da literatura indicaram a sub-região 9p21 como bastante importante também no processo de formação de tumores de cavidade bucal, principalmente por conter os genes supressores de tumor *CDKN2A* e *CDKN2B*. A presença destes dois genes indica a possibilidade da perda da supressão tumoral envolver a inativação de um ou ambos os genes. Deleções em 9p21 que removam ambos os genes (ou mutações que possam inativá-los) podem simultaneamente eliminar duas das principais vias de controle da proliferação celular (KAMB et.al., 1994). Estes genes codificam proteínas inibidoras de ciclinas dependentes de quinases (CDKIs), regulando negativamente a fase G1 do ciclo celular. Perdas de heterozigose freqüentes na região 9p21 e a inativação conjunta do gene *CDKN2A* por diferentes mecanismos têm sido descritas em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (PAPADIMITRAKOPOULOU, 1997). Além destes, outros possíveis genes supressores podem estar presentes na região e, de alguma maneira, estarem contribuindo na tumorigênese bucal.

Em muitos estudos que analisam LOH em tumores de cabeça e pescoço, os diferentes sítios anatômicos não são distinguidos. Entretanto, sabe-se que o comportamento biológico varia entre os diferentes tipos tumorais (boca, faringe e laringe), sugerindo propriedades intrínsecas distintas. Segundo REIS et al. (2002), isto se reflete no padrão de crescimento, comportamento clínico e prognóstico, de modo que os diferentes sítios anatômicos não devem ser considerados como entidade única. Por isto, no presente trabalho, foram analisadas amostras de pacientes portadores de tumores primários exclusivamente do tipo carcinoma de

células escamosas de cavidade bucal, utilizando-se seis marcadores microssatélites em 9p (D9S157, D9S1749, D9S1748, D9S200, D9S171 e D9S169) (Tabela 2). Estes marcadores encontram-se mapeados nas sub-regiões 9p21 e 9p22-23 do braço curto do cromossomo 9 que, como acima citado, são candidatas a conterem genes supressores tumorais.

As freqüências de LOH encontradas neste trabalho para cada um dos seis marcadores analisados estão descritas na Tabela 4. Em todos os locos estudados foram encontradas altas freqüências de perdas alélicas, sendo todas superiores a 20%. Além disso, dos seis marcadores analisados, três (D9S157, D9S200 e D9S169) mostraram freqüências de LOH superiores a 30%.

Em estudo com o objetivo relacionar diversas alterações genéticas, incluindo mutações, deleções, perdas de heterozigose, eventos de metilação e outros, com a etiologia de lesões bucais cancerosas, KLESTY (2002) obtiveram, para LOH, resultados bastante semelhantes aos apresentados no nosso trabalho. Os autores analisaram os microssatélites D9S157, D9S1748 e D9S171 e obtiveram freqüências de LOH de 42,1%, 35,0% e 82,4%, respectivamente. Em nossa análise, D9S157 apresentou freqüência de 34% e D9S1748 de 28,57%. Em relação ao marcador D9S171, a freqüência obtida foi de 22,5%, muito discrepante dos 82,4% obtidos pelos autores citados. Porém, XIAO (2001), analisando o mesmo microssatélite D9S171 em amostras de carcinomas de células escamosas de cavidade bucal, encontraram uma freqüência de 21,05%, muito semelhante aos 22,5% obtidos pelo nosso trabalho. Uma das razões sugeridas para estas diferenças seria a utilização pelos primeiros autores de amostras de tumores de cabeça e pescoço em geral, e não somente de tumores de cavidade bucal.

Portanto, alterações nesse marcador microssatélite podem ser mais relevantes na etiologia de tumores como de faringe ou laringe, não estando muito relacionadas com cavidade bucal em si. Outras razões possíveis seriam o tamanho da amostra e diferenças metodológicas, uma vez que os autores citados utilizaram métodos baseados em eletroforese em gel de poliacrilamida.

NAKANISHI (1999), analisando uma amostra de 34 casos informativos de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, encontraram 18 (53%) de pacientes com LOH em um ou mais locos observados. Com base nesses resultados, duas regiões comumente deletadas foram identificadas: 9p22, onde o gene supressor de tumor *IFNA* já havia sido mapeado, e a região do microssatélite D9S157, também em 9p22, telomérica ao loco do *IFNA* (Interferon alfa). Também MAHALE (2000), em estudo com 11 microssatélites em pacientes portadores de carcinoma de células escamosas, observaram 52% de LOH e, destas, 85% estavam concentradas na região 9p21-23, entre os marcadores D9S157 e D9S161. Nossos resultados corroboram os acima descritos na literatura, indicando a importância da região 9p21-23 na etiologia do câncer bucal. Assim, podemos afirmar que o gene *IFNA* é um forte candidato a supressor tumoral envolvido com esses tumores, e além disso, nossos resultados nos permitem sugerir a existência de outros genes supressores ainda não clonados em 9p21-23.

Em outro trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa com a mesma amostra de tumores de cavidade bucal, desta vez analisando LOH em 3p, também foram observadas frequências elevadas de perdas alélicas, que variaram de 37,15% a 55,55% (LOSI-GUEMBAROVSKI, 2007). As frequências observadas em 3p foram numericamente superiores àquelas obtidas em 9p, o que talvez possa

indicar 3p como um *hot spot* na carcinogênese de cabeça e pescoço. Entretanto, sabe-se que o desenvolvimento de um tumor não é um processo único, mas sim decorrente de alterações em várias regiões genômicas e, segundo os resultados obtidos em nosso grupo, pode-se sugerir que ambas as regiões estudadas possuem um papel relevante em tumores bucais.

A análise dos parâmetros histopatológicos (tamanho do tumor, invasão de linfonodos regionais e grau de diferenciação tumoral) e clínico (ocorrência ou não de óbito) dos pacientes em função dos marcadores microssatélites foi realizada e os resultados se encontram nas Tabelas de 5 a 9. A análise da variância realizada para a comparação entre as médias dos tamanhos dos tumores dos pacientes com e sem LOH para os seis marcadores microssatélites não demonstrou diferenças estatisticamente significativas (Tabela 6). O número de pacientes com e sem LOH com grau II e III de diferenciação tumoral e que foram a óbito também se apresentou homogeneamente distribuído de acordo com o teste do qui-quadrado, tanto quando cada marcador foi analisado isoladamente (Tabelas 7 e 8), como quando os resultados foram analisados em conjunto. Com relação ao grau de diferenciação tumoral, era esperada ausência de diferença estatística entre tumores moderadamente diferenciados e bem diferenciados. Entretanto, não foi possível uma comparação entre tumores de grau I (pouco diferenciados) e grau III (bem diferenciados), devido ao baixo número amostral dos primeiros (n=2).

Entretanto, a análise conjunta dos resultados obtidos em todos os marcadores microssatélites analisados para o parâmetro invasão de linfonodos regionais, apresentou um valor de qui-quadrado significativo ($\chi^2_1=4,121$, $P<0,05$),

indicando que o número de pacientes com e sem LOH e com e sem invasão de linfonodos regionais não se distribuem igualmente. Isto pode indicar que a inativação de genes localizados principalmente em 9p21 poderia ser um evento mais tardio no processo de tumorigênese e que estes genes poderiam ainda estar relacionados a um pior prognóstico. Assim, poderíamos sugerir que os genes *CDKN2A* e *CDKN2B*, localizados em 9p21, teriam uma função relevante em eventos mais tardios do processo de tumorigênese bucal. Entretanto, acreditamos que estes achados devem ser confirmados para um melhor esclarecimento do papel deste candidato a supressor tumoral na carcinogênese de boca, especialmente devido ao baixo número amostral disponível para a análise desta sub-amostra.

Como já citado, para realizarmos as análises entre os parâmetros histopatológicos e clínico dos pacientes houve uma redução do número amostral devido à falta de algumas informações. Assim, tanto a ausência de significância estatística para três dos parâmetros analisados, quanto à presença de significância para invasão de linfonodos regionais, podem ter sido influenciadas pela diminuição de poder estatístico, o que sugere cautela na avaliação dos resultados apresentados. Porém, os mesmos devem ser reavaliados em amostras mais consistentes pela relevância que podem representar.

De maneira geral, nossos resultados sugerem que a região cromossômica 9p está envolvida com o desenvolvimento de carcinomas da cavidade bucal e que as sub-regiões estudadas, por terem apresentado freqüências elevadas de LOH quando comparadas a outros estudos descritos na literatura, podem conter genes supressores tumorais ainda desconhecidos, envolvidos na etiologia e na

progressão desta doença. Além disso, em função da alta taxa de LOH em dois dos seis marcadores (superior a 50%), podemos sugerir que os genes *IFNA*, *CDKN2A* e *CDKN2B* são dois fortes candidatos a supressores tumorais correlacionados ao surgimento de carcinomas bucais.

7. CONCLUSÕES

8. REFERÊNCIAS

AH-SEE, K.W.; COOKE, T.G.; PICKFORD, I.R.; SOUTAR, D.; BALMAIN, A. An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. **Cancer Res.**, 54(7):1617-21, 1994.

ANDL, T.; KAHN, T.; PFUHL, A. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. **Cancer Research**, 58: 5-13, 1998.

ANDO, Y.; IWASE H, ICHIHARA S, TOYOSHIMA S, NAKAMURA T, YAMASHITA H, TOYAMA T, OMOTO Y, KARAMATSU S, MITSUYAMA S, FUJII Y, KOBAYASHI S. Loss of heterozygosity and microsatellite instability in ductal carcinoma in situ of the breast. **Cancer Letters**, 156:207-14, 2000.

ANDREOTTI, M.; RODRIGUES, A.N.; CARDOSO, L.M.N.; FIGUEIREDO, R.A.O.; ELUF-NETO, J. and WÜNSCH-FILHO, V. Ocupação e câncer da cavidade oral e orofaringe. **Cadernos de Saúde Pública**, 22:543-552, 2006.

ARAI, K.; SHIBAHARA, T.; YAMAMOTO, N.; NOMA, H. The presence of candidate tumor suppressor gene loci at chromosome 3p for oral squamous cell carcinomas, **Oral Oncol.**, 38: 763-771, 2002.

BAATENBURG DE JONG, R.J.; KNEGT, P.; VERWOERD, C.D. Reduction of the number of neck treatments in patients with head and neck cancer. **Cancer**, 71: 2312-2318, 1993.

BALDWIN, C.; GARNIS, C.; ZHANG, L.; ROSIN, M. and LAM, W.L. Multiple Microalterations Detected at High Frequency in Oral Cancer. **Cancer Research**, 65:7561-7567, 2005.

BARTSCH, H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. **Mut. Res.**, 462: 255-279, 2000.

BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ed. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, SP. 1988.

BIAZEVIC, M.G.H.; CASTELLANOS, R.A.; ANTUNES, J.L.F. and MICHEL-CROSATO, E. Tendências de mortalidade por câncer de boca e orofaringe no Município de São Paulo, Brasil, 1980/2002. **Cadernos de Saúde Pública**, 22: 2105-2114, 2006.

BIÈCHE, I.; LIDERAU, R. Genetic alterations in breast cancer. **Genes, Chromosomes and cancer**, 14: 227-251, 1995.

CALIFANO, J.A.; JOHNS, M.M.; WESTRA, W.H.; LANGO, M.N., et.al. An allelotype of papillary thyroid cancer. **Int. J. Cancer**. 69:442-444, 1996.

CANEVARI, R.A.; ROGATTO, S.R. Câncer de Cabeça e Pescoço. IN: **Oncologia Molecular**. Org. Casali, JC; Ferreira, CG. Editora Atheneu, São Paulo-SP, 2004.

CARRANO, A.V.; NATARAJAN, A.T. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. **Mut. Res.**, 204:381, 1988.

CARVALHO, A.L.; SINGH, B.; SPIRO, R.H.; KOWALSKI, L.P. and SHAH, J.P. Câncer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nations. **Head Neck**, 26:31-38, 2004.

CAVENEY, W.K.; WHITE, R.L. The Genetic bases of cancer. An accumulation of genetic defects can apparently cause normal cells to become cancerous and cancerous cells to become increasingly dangerous. **Sci. Am.**, 50-57, 1995.

CENGIZ, B.; GUNDUZ, M. Fine deletion mapping of chromosome 2q21-37 shows three preferentially deleted regions in oral cancer. **Oral Oncology**, 2006.

CLARK, A. Oral cancer prevention and early detection. **Nurs. Stand.**, 13: 43-47, 1999.

CAWKWELL, L.; BELL, S.M.; LEWIS, F.A.; DIXON, M.F.; TAYLOR, G.R.; QUIRKE, P. RAPID DETECTION OF ALLELE LOSS in colorectal tumours using microsatellites and fluorescent DNA technology. **Br. J. Cancer**. 67:1262-1267, 1993.

COOPER, G. M. Elements of human cancer. 1.ed. Boston: **Jones and Bartlett Publishers**, 1994.

DAMM, N.; BOUQUOT, A. Patologia Epitelial. In: **Patologia Oral e Maxilofacial**, 287-296, 1998.

EL-SAYED, S.; NELSON, N. Adjuvant and adjunctive chemotherapy in the management of squamous cell carcinoma of the head and neck region: a meta-analysis of prospective and randomized trials. **J. Clin. Oncol.**, 14: 838-847, 1996.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, 61: 759-767, 1990.

FEARON, E.R. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. **Science**, 278: 1043-1050, 1997.

FERREIRA, M.E.; GUATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **Embrapa-Cenargem**, Brasília, 1998.

FLAITZ, C.M.; NICHOLS, C.M.; ADLER-STORTHZ, K. et.al. Intraoral squamous cell carcinoma in human immunodeficiency syndrome virus infection: a clinicopathology study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, 80: 55-62, 1995.

FRANCO, E.L.; KOWALSKI, L.P.; OLIVEIRA, B.V.; CURADO, M.P.; PEREIRA, R.N.; SILVA, M.E.; FAVA, A.S. and TORLONI, H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case control study. **International Journal of Cancer**, 43: 992-1000, 1989.

GAO, S.; WORM, J.; GULDBERG, P. Loss of HETzygosity at 9q33 and hypermethylation of the DBCCR1 gene in oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer.**, 91: 760-764, 2004.

GOLDSTEIN, A.M.; BLOT, W.J.; GREENBERG, R.S. et.al. Familial risk in oral and pharyngeal cancer. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, 30B: 319-322, 1994.

GREIDER, C.W.; BLACKBURN, E. **Sci. Am.**, 2:80-85, 1996.

GUPTA, P.C.; MURTI, P.R.; BHONSLE, R.B. et.al. Effect of cessation of tobacco use on the incidence of oral mucosal lesions in a 10 year follow-up study of 12.212 users. **Oral Dis.**, 1: 54-58, 1995.

HAMADA, G.S.; BOS, A.J.; KASUGA, H. and HIRAYAMA, T. Comparative epidemiology of oral cancer in Brazil and India. **Tokai J. Exp. Clin. Med**, 16:63-72, 1991.

HOEIJMAKERS, J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, 411: 366-374, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2005>. INCA, Rio de Janeiro, 2006.

ISHWAD, C.S.; FERRELL, R.E.; ROSSIE, K.N.; APPEL, B.N.; JOHNSON, J.T.; MYERS, E.N.; LAW, J.C.; SRIVASTAVA, S.; GOLLIN, S.M. Loss of HETzygosity of the short arm of chromosomes 3 and 9 in oral cancer. **Int. J. Cancer**. 69:1-4, 1996.

JOHNSON, N.W. **Ed. Oral Cancer: detection of patients and lesions at risk**. Cambridge University Press, Cambridge, 1991.

JOHNSON, N.W.; WARNAKULASURIYA, X.A. Epidemiology and etiology of oral cancer in the United kingdom. **Community Dental Health**, 10: 1330, 1993.

JOVANOVIC, A.; KOSTENSE, P.J.; SCHULTEN, E.A.; et.al. Delay in diagnosis of oral squamous cell carcinoma: a report from the Netherlands. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, 28B: 37-38, 1992.

KEMP, C.J. Comparative hepatocellular cancer genetics. **Am. J. Pathol.**, 159: 975-977, 1999.

KNUDSON, A.G. Mutation and cancer: a statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, 68: 820-823, 1971.

KNUDSON, A.G. Hereditary cancer, oncogenes and anti-oncogenes. **Cancer Res.**, 45: 1437-1443, 1985.

KRESTY, L.A.; MALLERY, S.R.; KNOBLOCH, T.J.; SONG, H.; LLOYD, M.; CASTO, B.C.; WEGHORST, C.M. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. **Cancer Research**, 62: 5295-300, 2002.

LAZARUS, P. e PARK, J.Y. Metabolizing enzyme genotype and risk for upper aerodigestive tract cancer. **Oral Oncol.** 36(5): 421-431, 2000.

LEE, J.J.; HONG, W.K.; HITTELMAN, W.N. Predicting cancer development in oral leucoplakia: ten years of translocation research. **Clin. Cancer Res.**, 6:1702-1710, 2000.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, 396: 643-649, 1998.

LIPPMAN, S. e HONG, W.K. Molecular markers of the risk of oral cancer. **N. Engl. Med.**, 344: 1323-1326, 2001.

MAESTRO, R.; GASPAROTTO, D.; VUKOSAVLJEVIC, T.; BARZAN, L.; SULFARO, S.; BOIOCCH, M. Three discrete regions of deletion at 3p in head and neck cancers. **Cancer Res.**, 53(23):5775-5779, 1993.

MAHALE, A.; SARANATH, D. Microsatellite alterations on chromosome 9 in chewing tobacco-induced oral squamous cell carcinomas from Índia. **Oral Oncology**, 36: 199-206, 2000.

McMAHON, S. and CHEN, A.Y. Head and neck cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, 22:21-24, 2003.

NAGPAL, J.K. and DAS, B.R. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. **Oral Oncology**, 39:213-221, 2003.

NAKANISHI, H.; WANG, X.L.; IMAI, F.L.; KATO, J.; SHIIBA, M.; MIYA, T.; IMAI, Y.; TANZAWA, H. Localization of a novel tumor suppressor gene loci on chromosome 9p21-22 in oral cancer. **Anticancer research**, 19: 29-34, 1999.

NAWROZ, H.; KOCH, W.; ANKER, P.; STROUN, M.; SIDRANSKY, D. Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients. **Nat Med**. 2(9):1035-1037, 1996.

NEVILLE, B.W.; DAMN, D.D.; ALLEN, C.M. et.al. **Oral & Maxillofacial Pathology**. 2nd ed. Saunders. Philadelphia, 337-369, 2002.

NUMASAWA, H.; YAMAMOTO, N.; KATAKURA, A. and SHIBAHARA, T. Loss of Heterozygosity and Microsatellite Instability on Chromosome 2q in Human Oral Squamous Cell Carcinoma. **Bull Tokio Dent Coll**, 46:17-25, 2005.

NUNN, J.; NAGINI, S.; RISK, J.M.; PRIME, W.; et.al. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol.**, 39: 115-129, 2003.

PAPADIMITRAKOPOULOU, V.; IZZO, J.; LIPPMAN, S.M.; LEE, J.S.; FAN, Y.H.; CLAYMAN, G.; RO, J.Y.; HITTELMAN, W.N.; LOTAN, R.; HONG, W.K.; MAO, L. Frequent inactivation of p16INKa in oral premalignant lesions. **Oncogene**, 14: 1799-803, 1997.

PARMIGIANI, R.B. e CAMARGO, A.A. O genoma humano e o câncer. **Oncologia Molecular**. Ferreira, C.G.; Rocha, J.C. (eds) Editora Atheneu, São Paulo, 3-11, 2004.

PERERA, F.P. Environment and cancer: Who are susceptible? **Science**, 278: 1068-1073, 1997.

PEREZ-ORDOÑEZ, B.; BEAUCHEMIN, M. and JORDAN, R.C.K. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Journal of Clinical Pathology**, 59: 445-453, 2006.

RAI, R.; KULKARNIB, V. and SARANATHB, D. Genome wide instability scanning in chewing-tobacco associated oral cancer using inter simple sequence repeat PCR. **Oral Oncology**, 40: 1033-1039, 2004.

REIS, P.P.; POLI-FREDERICO, R.C.; SANTOS, R.M.; NISHIMOTO, I.N.; KOWALSKI, L.P. and ROGATTO, S.R. Distinct regions of loss of heterozygosity on 22q at different sites of head and neck squamous cell carcinomas. **Med Sci Monit**, 8:89-94, 2002.

RODRIGUEZ, T.; ALTIERI, A.; CHATENOLD, L.; GALLUS, S.; BOSETTI, C.; NEGRI, E.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; TALAMINI, R. and VECCHIA, C.L. Risk

factors for oral and pharyngeal câncer in young adults. **Oral Oncology**, 40: 207-213, 2004.

RODRIGUEZ-MONGE, E.J.; SHIN, D.M. and LIPPMAN, S.M. Head and Neck Cancer. **Medical Oncology: A Comprehensive Review**, 1995, 1997.

ROSIN, M.P.; CHENG, X.; POH, C. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. **Clin. Cancer Res.**, 6: 357-362, 2000.

ROSSI, B.M.; PINHO, M. **Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião**. In: Mutaçãõ, Câncer, Oncogenes e Genes Supressores de Tumor: Um Equilíbrio. Marina ISBN. São Paulo, 1999.

ROUNTREE, M.R.; BACHMAN, K.E.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. DNA methylation, chromatin inheritance and cancer. **Oncogene**, 20: 3156-3165, 2001.

SCHLECHT, N.F.; FRANCO, E.L.; PINTOS, J.; NEGASSA, A.; KOWALSKI, L.P. and OLIVEIRA, B.V. Interaction between tabaco and alcohol consumption and the risk of cânceres of the upper aero-digestive tract in Brazil. **American Journal of Epidemiology**, 150: 1129-37, 1999.

SCULLY, C.; PORTER, S. **Oral Cancer**. BMJ, 321: 97-100, 2000.

SERRANO, M.; HANNON, G.J.; BEACH, D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature**, 366: 704-707, 1993.

SESSIONS, R.B.; HARRISON, L.B.; HONG, W.K. Tumors of the larynx and hypopharynx. **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, Vol. 1, DeVita Jr. VT, Hellman S, Rosenberg SA eds J B Lippincott Co, Philadelphia, 1997.

SHANTZ, S.P.; HARRISON, L.B.; HONG, W.K. Tumors of the nasal cavity, and paranasal sinuses, nasopharynx, oral cavity, and oropharynx. **Cancer: Principles and Practice of Oncology**, Vol 1 DeVita Jr. VT, Hellman S, Rosenberg SA eds J B Lippincott Co, Philadelphia, 1997.

SILVERMAN, S.JR. Epidemiology. In: **Silverman S. Jr. ed. Oral Cancer**. 4th ed. BC Decker Inc. Hamilton, 1-6, 1998.

SILVERMAN, S.JR. Demografics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. **J. Am. Dent. Assoc.**, 132:7S-11S, 2001.

SUDBO, J.; KILDAL, W.; RISBERG, B.; KOPPANG, H.S.; et al. DNA content as a prognostic marker in patients with oral leucopakia. **N. Engl. J. Med.**, 344: 1270-1278, 2001.

SUGERMAN, P.B.; SHILLITOE, E.J. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: Evidence for and against a causal relationship. **Oral Dis.**, 3: 130-147, 1997.

SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. **Mut. Res.**, 402: 7-14, 1998.

VAN DER RIET, P.; NAWRAZ, H.; HRUBAN, R.H. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. **Cancer Research**, 54: 1156-1158, 1994.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. The multistep nature of cancer. **Trends Genet.** 9:138-41, 1993.

WARNALULASURIYA, S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. **J Pathol**, 190: 407-409, 2000.

WEINBERG, R.A. Tumor suppressor genes. **Science**, 254: 1138-1146, 1991.

WEINBERG, R.A. The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. **Science**, 230: 770-776, 1985.

WÜNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral oncology**, 38:737-746, 2002.

WÜNSCH-FILHO, V and CAMARGO, E.A. The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: epidemiologic issues. **Semin Oncol**, 28:158-168, 2001.

YAMAMOTO, N.; MIZOE, J.; NUMASAWA, H.; TSUJII, H.; SHIBAHARA, T.; NOMA, H. Allelic loss on chromosomes 2q, 3p and 21q: possibly a poor prognostic factor in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, 39: 795-805, 2003.

YAMASHITA, Y.; MIYAKAWA, A. Genetic aberration on chromosome 10 in human oral squamous cell carcinoma. **Int J Oncol.**, 20: 595-598, 2002.

YEE, J.C.; ROODI, N. et.al. Microsatellite instability and loss of HETzygosity in breast cancer. **Cancer Res.**, 54: 1641-1644, 1994.

XIAO, L.; IOL, N.; LUO, Z. Microsatellite instability and loss of HETzygosity in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao**, 32: 372-375, 2001.

XU, X.F.; GAO, Y.N.; CHENG, S.J. Detailed deletion mapping of loss of HETzygosity on 9p13-23 in laryngeal squamous cell carcinoma by microsatellite analysis. **Chin. Med. J. (Engl)**, 117: 1204-1209, 2004.

ZAKRZEWSKA, J.M. Fortnightly review: Oral Cancer. **BMJ**, 318: 1051-1054, 1999.

9. ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO

CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo. Entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue e, onde couber, coleta de material da lesão). Fui informado de que não estou correndo nenhum risco ao fazer esta doação.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar deste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual.

Estou ciente de que, ao participar desta pesquisa, meus dados pessoais serão mantidos em absoluto sigilo e as amostras que forneci serão devidamente estocadas e farão parte de um banco de DNA nas universidades envolvidas.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo com a Prof^a. Dr^a. Enilze M. S. F. Ribeiro, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessárias para a minha compreensão do estudo.

_____ Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Prof^a. Dr^a. Enilze Ribeiro, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador ou responsável.

_____ Data: __/__/__

Enilze M. S. F. Ribeiro

QUESTIONÁRIO PESSOAL

Por favor, leia as questões seguintes cuidadosamente e responda-as da forma mais completa e precisa possível. A informação que você der não será associada a seu nome em nenhum documento público, e será conhecida somente dos principais pesquisadores deste estudo. Estas informações terão influência direta na interpretação de nossos resultados, portanto, pedimos que coopere gentilmente, fornecendo-as corretamente. Obrigado pelo interesse.

1- Iniciais:

2- A ser preenchido pelo pesquisador:

Código: _____

Data: ___/___/___

Esta folha deve ser destacada do restante do questionário e preenchida pelo pesquisador. Somente o código será usado como identificação para as páginas subsequentes. Se for necessário espaço adicional para complementar a sua resposta, por favor escreva no verso da página e identifique a parte restante da questão com seu respectivo número.

Código nº _____

HISTÓRIA PESSOAL

- 1- Registro hospitalar: _____
- 2- Sexo: () masculino () feminino
- 3- A qual grupo étnico você pertence ?
 Negro () Caucasiano (branco) () Asiático () Indígena () Outros ()
- Idade: _____
- Local de nascimento: Paraná ? () sim () não
 Se não : Que região brasileira ? Norte () Sul () Nordeste ()
 Centro-Oeste () Sudeste ()
- Número de filhos: (i.e. não se incluem filhos adotados): a) 0 b) 1 c) 2 d) + de 2
- 6- Sua moradia era na zona rural ou urbana? () Rural () Urbana
- 7- Quanto tempo viveu neste local? _____anos _____meses
- 8- No local onde morou por mais tempo qual era o tipo de moradia?
 () casa () apartamento () barraco () cortiço () outra
- 9- A residência onde mora é servida por água encanada? () sim () não
- 10- Qual o seu grau de instrução?
 () analfabeto () 1º grau incompleto () 1º grau completo () 2º grau incompleto
 () 2º grau completo () técnico () profissional () superior
- 11- Qual sua religião? a) () Católico b) () Protestante c) () Outras

Histórico de moradia

- 12- Qual era o tipo de construção onde você morou mais tempo?
 () alvenaria () madeira () barro () mista
- 13- Que tipo de cobertura tinha essa moradia? () telha barro comum () laje
 () folha de zinco () brasilite-eternit () sapé () outro (qual?) _____
- 14- Você poderia me contar se morou a menos de 1 Km de uma destas indústrias por mais de 1 ano?

Indústria têxtil ou tecelagem	() sim	() não
Processamento de madeira	() sim	() não
Papel ou celulose	() sim	() não
Fábrica de sapatos ou curtume	() sim	() não
Metalúrgica (cromo/níquel)	() sim	() não
Usina de açúcar ou álcool	() sim	() não
Plástico ou borracha	() sim	() não
Refinaria de petróleo	() sim	() não

Histórico de exposição relacionado ou não ao trabalho

15- Você já se expôs a alguma destas substâncias abaixo em seu trabalho?

Se SIM, por quanto tempo e a quanto tempo foi

isso: _____

Derivados de petróleo (querosene, gasolina, solventes,...)	() sim	() não
Tintas/ corantes	() sim	() não
Indústrias têxteis ou tecelagem	() sim	() não
Praguicidas / Herbicidas	() sim	() não
Radiação	() sim	() não
Metais pesados (Pb, Ni, Cr,...)	() sim	() não
Processamento de madeira	() sim	() não
Papel ou celulose	() sim	() não
Mineração	() sim	() não
Fábrica de sapatos ou curtume	() sim	() não
Metalúrgica	() sim	() não
Usina de açúcar ou álcool	() sim	() não
Plástico ou borracha	() sim	() não
Outras substâncias químicas:	() sim	() não

26- Se já parou, há quanto tempo parou de consumir esta bebida?

a) 0-5 anos. b) 5 –10 anos. c) mais 10 anos.

27- Que tipo de bebida alcóolica você costuma/ costumava consumir ?

a) Destiladas b) Não-Destilada c) Outra

28- Quanto você costuma/ costumava beber por semana?

no máximo um copo de 2 a 5 copos de 6 a 10 de 11 a 30 mais de 30

29- Durante a sua vida, já consumiu ou consome alguma bebida diariamente por mais de 6 meses continuamente?

a) Sim b) Não

Histórico de Saúde

30- Há cerca de um ano você tem se automedicado com, por exemplo, aspirinas, antiácidos, antihistamínicos, sedativos, ou outras drogas? sim não

não sabe

31- Você toma vitaminas freqüentemente ou tem tomado nos últimos seis meses?

sim não não sabe

32- Você já operou da garganta (amígdalas)? sim não

33- Você se submeteu a algum Raio-X de cabeça e pescoço recentemente ?

sim não

34- Se SIM, quantos ? a) Menos de 10 vezes b) Mais de 10 vezes

35- Você já teve as seguintes doenças?

Bronquite asmática Pressão alta Diabetes Tuberculose Câncer (localização do tumor _____)

36- Em casos de câncer na família, qual era o vínculo de parentesco?

Pai Mãe Irmão Filho Tio Primo Outro

37- Qual foi a localização do tumor?

Boca/garganta Pulmão Estômago Intestino Ginecológico
 Mama Outro (qual?) _____

38- Você já teve alguma moléstia venérea?

a) ()sim b) ()não

Histórico de Saúde Dentária

39- Você usa/usou dentadura ou aparelho móvel? () sim () não

40- (Se sim) há quanto tempo? a) ()0-5 anos b) ()5 –10 anos c) ()mais 10 anos.

41- Esta dentadura já lhe causou alguma ferida na boca? () sim () não

42- Com que frequência você vai ao dentista? () nunca () <1/ano () >1/ano

43- Você tem algum dente estragado? () sim () não

44- (Se sim) eles estão lhe machucando? () sim () não

Histórico alimentar: (refira-se somente a hábitos freqüentes)

45- De qual tipo é o fogão da sua casa? () gás () lenha () elétrico () outro

46- Já residiu em casa com fogão a lenha? () sim () não

47- Você tem o hábito de ingerir alimentos e bebidas muito quentes ?

() sim () não

48- Você toma chimarrão? () sim () não

49- Você se alimenta apenas de vegetais? ()sim ()não

50-Você come carne? ()sim ()não

51-Se SIM, com que freqüência você come estes alimentos:

Dias/Semana

	1-2	3-4	5-6	Diariamente
Carne	()	()	()	()
Peixe	()	()	()	()
Frango	()	()	()	()
Porco	()	()	()	()
Outros	()	()	()	()

Histórico genético

52-Para mulheres: você já sofreu algum aborto espontâneo? ()sim ()não

53-Para ambos os sexos: você possui algum(a) irmão(a) gêmeo idêntico?

()sim ()não

Incluir informações das amostras do tumor:

Suspeita clínica:

Laudo Histopatológico:

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)