

JULIANE CRISTINA SILVA DE AZEVEDO

**Mutações no gene *TP53* em carcinomas de cavidade oral:  
características clínico-patológicas e associação com fatores de  
risco na população do RS.**

Dissertação de mestrado  
Programa de Pós-graduação em  
Patologia da Fundação Faculdade Federal  
de Ciências Médicas de Porto Alegre

ORIENTADOR: Prof. Dr. Cláudio Osmar Pereira Alexandre

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Atalábio Hartmann

Porto Alegre

2006

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

A994d **Azevedo, Juliane Cristina Silva de**

Mutações no gene *TP53* em carcinomas de cavidade oral: características clínico-patológicas e associação com fatores de risco na população do RS/ Juliane Cristina Silva de Azevedo; orient. Cláudio Osmar Pereira Alexandre; co-orient. Antonio Atalábio Hartmann. Porto Alegre: FFFCMPA, 2006. 90 fl.; il.; tab.

Dissertação (Mestrado) Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre. Programa de Pós – Graduação em Patologia.

1. Carcinoma epidermóide. 2. Boca. 3. *TP53*. 4. Mutação. 5. IH. 6. Mutação. I. Alexandre, Cláudio Osmar Pereira. II. Hartmann, Antonio Atalábio. III. Título.

CDD 616. 99431  
CDU 616 .006.6

Ruth Oliveira / Bibliotecária  
CRB10/501

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Expedito e Roseli, que são as pessoas mais importantes da minha vida, as quais tenho profundo amor, respeito e admiração pelo carinho, entrega e ensinamentos recebidos para trilhar os caminhos do Bem.

À minha irmã, Mariana pelo incentivo permanente, por estar sempre ao meu lado, pelo exemplo de persistência e de amizade.

À minha irmã Luciane e ao meu cunhado Cristiano pelo exemplo de amor e união compartilhados.

Ao meu namorado Juan pelo seu amor, companheirismo e compreensão.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela minha vida e por todas as oportunidades que me foram dadas.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Cláudio Osmar Pereira Alexandre e Prof. Dr Antonio Atalábio Hartmann pelos conhecimentos transmitidos, disponibilidade para orientação e possibilidade de desenvolver esse projeto.

À Dra Marinez Bizarro Barra, Patologista do Laboratório de Patologia do hospital Santa Rita de Porto Alegre do Complexo Hospitalar Santa Casa, pela sua impecável sabedoria nos diagnósticos e pela amizade.

À Dra Karla Pêgas patologista responsável pelos laudos da imunohistoquímica, pela sua dedicação, inteligência e amizade.

À Dra Ana Paula Guedes Frazzon pelo seu exemplo de humildade, pelos ensinamentos de biologia molecular e à sua incessante disponibilidade para auxiliar no que fosse preciso.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Patologia Ivonice Oliveira Santos, pela dedicação, amizade e carinho despendidos.

Às funcionárias do Laboratório de Patologia do PPG em Patologia, Rosalva Thereza Meurer e Teresinha Stein pelo profissionalismo e atenção.

Às funcionárias do Laboratório de Biologia Molecular da FFFCMPA, Grasiela Agnes e Magda Brasil pelo empenho e dedicação a este trabalho.

Às alunas do curso de Medicina, Mariana Cristina Silva de Azevedo e Daisy Pradella, da Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas, pelo tempo dedicado a esse projeto, assim como pela amizade e compreensão.

Às colegas Andréa Pires Souto Damin, Darliza Calliari, Rúbia Rupenthal e Adriana Rohe que, com seus conhecimentos e experiências, colaboraram na execução desse trabalho.

Ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Porto Alegre, representado pelo Dr. Nilton Tabajara Herter pela oportunidade e confiança em disponibilizar os casos e também pelos conhecimentos transmitidos.

Aos residentes do Serviço de cirurgia de Cabeça e Pescoço, em especial ao Dr. Luis Felipe Ozowski e ao Dr. Rodrigo Leite pela incansável colaboração.

Aos meus mestres do PPG em Patologia pelos seus ensinamentos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>9</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>11</b>
<b>I INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>II REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>13</b>
II.1    EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE BOCA .....	13
II.2    HISTOPATOLOGIA, ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO .....	14
II.3    FATORES DE RISCO.....	18
II.3.1    Tabaco .....	18
II.3.2    Álcool.....	19
II.3.3    Mate .....	20
II.3.4    Agentes Virais.....	21
II.3.5    Suscetibilidade genética .....	22
II.4    BASES MOLECULARES DO CÂNCER.....	22
II.5    GENE SUPRESSOR DE TUMOR <i>TP53</i> .....	23
II.5.1    Considerações gerais.....	23
II.5.2    Mutações no gene <i>TP53</i> .....	24
II.6    PROTEÍNA P53.....	26
II.6.1    Ativação da proteína p53 .....	28
II.6.2    Detecção da proteína p53.....	28
II.6.3    A proteína p53 e o câncer de boca .....	29
<b>III OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
III.1    OBJETIVO GERAL.....	30
III.2    OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>IV ASPECTOS ÉTICOS.....</b>	<b>31</b>
<b>V REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>32</b>
<b>VI ARTIGO CIENTÍFICO .....</b>	<b>42</b>
VI.1    TÍTULO .....	42
VI.2    AUTORES .....	42
VI.3    RESUMO.....	42
VI.4    INTRODUÇÃO .....	43
VI.5    MATERIAL E MÉTODOS.....	44
VI.6    ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
VI.7    RESULTADOS .....	47
VI.8    DISCUSSÃO .....	48
VI.9    REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
<b>VII ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS .....</b>	<b>59</b>
VII.1    TITLE.....	59
VII.2    AUTHORS .....	59
VII.3    ABSTRACT.....	59
VII.4    INTRODUCTION.....	60
VII.5    MATERIAL AND METHODS .....	61
VII.6    STATISTICAL ANALYSIS .....	63
VII.7    RESULTS.....	63
VII.8    DISCUSSION.....	65
VII.9    REFERENCES.....	70
<b>ANEXO A – REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO B – ANÁLISE MOLECULAR.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXO C – TABELAS E FIGURAS .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO.....</b>	<b>85</b>
<b>ANEXO E – QUESTIONÁRIO REFERENTE AO USO DE FUMO, ÁLCOOL E CHIMARRÃO .....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
C	Citosina
CECO	Carcinoma Epidermóide de cavidade oral
DNA	Ácido desoxirribonucléico
G	Guanina
IH	Imunohistoquímica
ISCMPA	Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre
HE	Hematoxilina e eosina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
FFFCMPA	Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PBS	Solução salina tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
T	Timina



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama do gene TP53 e da proteína p53. **A.** Representação dos 11 exons intercalados pelos 10 introns (os números indicam o tamanho no gene). **B.** Representação esquemática da proteína. Observam-se os domínios conservados (I a V) e o número de aminoácidos ([p53.free.fr/p53\\_Info/gene/p53GENE.html](http://p53.free.fr/p53_Info/gene/p53GENE.html)).....24
- Figura 2.** Fotomicrografia de reação imunohistoquímica anti-p53 positiva em 5% (A) e em 90% (B) das células de carcinoma de cavidade oral (400X).....83
- Figura 3.** Parte de um eletroferograma gerado pelo seqüenciador automático de DNA mostrando uma transição C>T no exon 7, códon 248, em um caso de carcinoma de cavidade oral (caso 13 da Tabela 7).....84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação TNM para o carcinoma epidermóide de boca.....	17
<b>Tabela 2.</b> Estadiamento.....	17
<b>Tabela 3.</b> Seqüência dos primers.....	80
<b>Tabela 4 .</b> Distribuição dos casos em relação ao gênero e à faixa etária.....	80
<b>Tabela 5.</b> Distribuição dos casos de acordo com o uso de fumo, álcool, mate e a média do tempo de exposição em anos.....	80
<b>Tabela 6.</b> Distribuição da positividade para p53 de acordo com o fator de risco.....	81
<b>Tabela 7.</b> Tabela demonstrativa dos tipos de mutações detectadas no gene <i>TP53</i> em amostras de carcinomas de cavidade oral de acordo com idade, gênero, IH, diferenciação tumoral e fatores de risco.....	82
<b>Tabela 8.</b> Tabela com o sumário das 13 mutações observadas no gene <i>TP53</i> nas amostras de 23 pacientes com carcinoma de cavidade oral.....	82

## RESUMO

O câncer da cavidade oral está entre as seis neoplasias mais comuns em homens no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), representando um importante problema de saúde pública. De etiologia multifatorial, o desenvolvimento deste câncer envolve fatores genéticos e ambientais. Na tentativa de identificar a frequência e os tipos de mutações no gene *TP53* em carcinomas epiderm Riipos tivCECO)co

## ABSTRACT

Oral cancer is among the six most commonly neoplasms found in males in the state of Rio Grande do Sul (Brazil), represented a significant public health issue. In order to identify the frequency and types of mutation in the *TP53* gene in oral carcinoma and possible associations with patient's life style, 40 cases were analyzed using immunohistochemistry (IH). Of then, 23 cases had exons 5, 6, 7 and 8 of the *TP53* gene sequenced. The sample included both males and females, with a predominance of males (3.4:1), average age was  $55.7 \pm 15.1$  years. The total cases, 62,5% presented with a tumor located on the tongue and 55.0% classified in stage IV. IH detected an accumulation of p53 protein in 72.5% of the cases. Thirteen mutations were found in the 23 sequenced cases, with 6 transversions, 5 transitions and 2 insertions, out of which 8 were missense, 3 silent and 2 frameshift. Most of these mutations were found on exon 6 (46.2%) and on exon 8 (23.0%). Twenty three per cent of the mutations were located in codons called *hotspots*. Although the mutation in the *TP53* gene is a frequent event in tumors of the oral cavity, no statistically significant correlations were found in relation to the investigated risk factors.

**Key words:** oral cancer, *TP53*, mutation, IH, sequencing.

## I INTRODUÇÃO

---

O carcinoma epidermóide de cavidade oral corresponde à cerca de 90% de todas as neoplasias malignas nesta topografia. De acordo com a Sociedade Americana do Câncer, esta neoplasia constitui cerca de 2% a 4% de todos os tumores malignos e é responsável por aproximadamente 2% das mortes por câncer em homens e em 1% das mulheres, nos Estados Unidos <sup>1,2</sup>.

No Brasil, a estimativa de incidência para o ano de 2006 foi de 10,91 casos por 100.000 habitantes para homens e de 3,58 para mulheres. Há uma variação nas taxas de incidência entre as diferentes regiões do país. As regiões com os maiores índices são a Sul e a Sudeste <sup>3</sup>.

A distribuição desse tipo de câncer também varia conforme o gênero, ocorrendo na proporção de 3 homens para 1 mulher. No entanto, essa diferença vem diminuindo ao longo dos anos. As faixas etárias mais acometidas estão entre a quinta e a sexta décadas de vida, sendo raro ocorrer em indivíduos com idade inferior a 40 anos <sup>1,2</sup>.

Diversos fatores de risco estão associados à histogênese deste câncer, particularmente o fumo e o álcool. Em razão da variedade de fatores envolvidos, é difícil analisar qual a contribuição específica de cada um deles <sup>3</sup>.

Atualmente, marcadores biológicos como a proteína p53 e o padrão mutacional do gene *TP53* têm sido utilizados como instrumentos indiretos no esclarecimento do papel de supostos fatores etiológicos na carcinogênese de diversos tipos de câncer. O acúmulo nuclear da proteína p53 e o padrão mutacional do gene *TP53* podem relacionar-se com o tipo de carcinógeno <sup>4</sup>.

## II REVISÃO DA LITERATURA

---

### II.1 Epidemiologia do Câncer de Boca

O carcinoma de cavidade oral é um dos tipos de câncer mais comum, sendo o oitavo tumor em incidência na população masculina. Esta incidência, contudo, varia bastante com relação à localização geográfica. Em países do sul da Ásia, como a Índia, o câncer de boca é a neoplasia maligna que mais acomete homens e, entre as mulheres, sua incidência é inferior somente aos cânceres de mama e de colo de útero. Outras regiões que apresentam alta incidência são o leste, o oeste e o sul da Europa, a Austrália, a Nova Zelândia e a Malásia. O Caribe e a América Latina apresentam índices de incidência intermediários, entretanto, mesmos nestes locais é grande a variação interna da ocorrência dessa neoplasia <sup>1, 2, 5, 6, 7</sup>.

Nos Estados Unidos, cerca de 28.000 homens e 12.000 mulheres, por ano, são diagnosticados com carcinoma de cabeça e pescoço, representando 3,2% de todos os novos casos de câncer diagnosticados. Destes, 38% são carcinomas epidermóides de cavidade oral, sendo responsável por 2,1% das mortes neste país <sup>8,9</sup>.

No Brasil, a estimativa de incidência para o ano de 2006 foi de 10,91 casos por 100.000 habitantes para homens e de 3,58 para mulheres. Há uma variação nas taxas de incidência entre as diferentes regiões do país. As regiões com os maiores índices são a Sul e a Sudeste, sendo consideradas áreas de alto risco <sup>3</sup>.

Além da variação geográfica, a distribuição do câncer de cavidade oral varia conforme o gênero, ocorrendo na proporção de três homens para 1 mulher afetada.

Convém ressaltar, porém, que a incidência está aumentando entre as mulheres, nos últimos anos. Essa tendência tem sido associada ao maior consumo de cigarro e álcool pelo sexo feminino <sup>10</sup>.

O carcinoma de cavidade oral ocorre com freqüência entre a quinta e a sexta décadas de vida <sup>11, 12,13</sup>.

A incidência do câncer de boca em indivíduos com idade inferior a 45 anos é baixa, apresentando taxas entre 0,24% e 9,0% <sup>14</sup>. De acordo com alguns estudos, casos em adultos jovens com idades entre 20 e 30 anos são mais agressivos, tendo pior prognóstico e um menor índice de sobrevida <sup>9,14,15</sup>. Já estudos como os de McGregor e cols. e de Clarke e cols. mostraram um alto índice de sobrevida entre os pacientes com idade inferior a 30 anos <sup>16,17</sup>. Outros ainda ressaltam que independentemente da idade o índice de sobrevida é similar tanto em jovens quanto em pacientes mais velhos <sup>18,19</sup>.

## **II.2 Histopatologia, aspectos clínicos e tratamento**

O carcinoma epidermóide é o tipo de neoplasia que mais acomete a cavidade oral, perfazendo cerca de 90% dos casos nessa topografia. Os 10% restantes estariam representados por linfomas, melanomas, sarcomas e por neoplasias malignas das glândulas salivares e dos tecidos odontogênicos. O carcinoma epidermóide também é chamado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular <sup>20,21</sup>.

O carcinoma epidermóide ou espinocelular ou, ainda, de células escamosas é caracterizado histopatologicamente por ilhas e cordões invasivos de células epiteliais malignas, que demonstram variados graus de diferenciação em direção à morfologia epidermóide <sup>21</sup>.

O carcinoma epidermóide de acordo com o grau de diferenciação tumoral pode ser classificado como bem, moderadamente e pouco diferenciado. De acordo com o tipo histológico pode ser classificado, além do tipo clássico, nas suas formas variantes como verrucoso, acantolítico, basalóide, fusocelular ou sarcomatóide, papilar, adenoescamoso, indiferenciado linfoepitelioma e indiferenciado de pequenas células <sup>22</sup>.

Os locais anatômicos comumente acometidos são a língua, o lábio inferior e o assoalho da boca, porém pode ocorrer também no trígono retromolar, rebordo alveolar, palato duro, palato mole, mucosa jugal e gengiva <sup>23,24,25,26</sup>.

O carcinoma epidermóide de boca possui uma apresentação clínica diversificada, variando de lesões ulceradas e infiltrativas a lesões exofíticas. Outras lesões menos sugestivas podem ocorrer sob a forma de placas brancas ou áreas eritematosas, ou mesmo uma combinação de ambas, o que torna a diferenciação dessas lesões de extrema importância para o diagnóstico correto <sup>27</sup>.

Os indivíduos com lesões iniciais de câncer de boca apresentam poucos sinais e sintomas, levando à procura de tratamento somente quando a doença já se encontra em estádios mais avançados. Isso resulta numa taxa de sobrevida baixa para a maioria dos pacientes <sup>28</sup>.

O câncer de boca evolui basicamente por extensão local e permeação linfática. A via linfática é o mais importante caminho de disseminação. Os linfonodos envolvidos são móveis e indolores inicialmente, tornando-se duros e fixos aos tecidos adjacentes com o passar do tempo. Usualmente o envolvimento linfático obedece a uma ordem anatômica, afetando inicialmente os linfonodos mais superiores, depois os médios e por último, os linfonodos cervicais baixos. Para um diagnóstico correto das lesões existentes, sempre que possível, deve-se palpá-las



para a determinação de seus reais limites de infiltração e comprometimento de estruturas adjacentes <sup>29</sup>.

Na ocasião do diagnóstico é preciso que se estabeleça o estágio da doença para que se possa ter um reflexo não somente da taxa de crescimento e extensão da neoplasia, mas também do tipo de tumor e da relação tumor-hospedeiro. Para auxiliar e complementar o diagnóstico, o exame de rotina utilizado é o histopatológico, o qual é realizado por meio de biópsia <sup>29, 30</sup>.

Como meio auxiliar na obtenção desse estágio a UICC (<http://www.uicc.org/>) preconiza o uso do sistema TNM, que trabalha prioritariamente com a classificação por extensão anatômica da doença, determinada clínica e histopatologicamente. Esse sistema tem por base a avaliação de três componentes, são eles: T – que se refere à extensão do tumor primário; N - à ausência ou presença e à extensão de metástase em linfonodos regionais e M - à ausência ou presença de metástase à distância (Tabela 1). A adição de números a esses componentes indica a extensão da doença. O estadiamento é dado de acordo com o T, o N e o M encontrados e serve como padrão para o prognóstico do paciente, conforme demonstrado na tabela 2, a seguir.

Duas classificações são descritas: classificação clínica ou pré-tratamento, designada por cTNM e classificação patológica ou classificação histopatológica pós-cirúrgica, designada pTNM <sup>29, 30</sup>.

**Tabela 1.** Classificação TNM para o carcinoma epidermóide de boca

---

**T - Tumor Primário**

Tx : tumor primário não-avaliável

T0 : sem evidência de tumor primário

Tis : carcinoma *in situ*

T1 : tumor de até 2 cm

T2 : tumor entre 2 cm e 4 cm

T3 : tumor maior que 4 cm

T4 : tumor de qualquer tamanho invadindo estruturas adjacentes

**N - Linfonodos Regionais**

Nx: Linfonodos não avaliáveis

No: Ausência de linfonodos regionais

N1: Metástase para um único linfonodo regional, homolateral, com no máximo 3 cm em sua maior dimensão

N2: Metástase em um único linfonodo, homolateral, maior que 3cm e menor que 6cm em sua maior dimensão (N2A) ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6cm em sua maior dimensão (N2b):ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum com mais de 6cm em sua maior dimensão (N2c).

N3: Metástase para linfonodo maior que 6cm.

**M – Metástases à distância:**

Mx: Metástase à distância não avaliável

M0: Ausência de metástase à distância

M1: Metástase à distância

---

Fonte: *TNM Classification of Malignant Tumors*. Sobin LH & Wittekind C. pp 272.  
Pub. John Wiley & Sons, Hoboken, N. Jersey, 6<sup>TM</sup> Ed, 2002.

---

**Tabela 2.** Estadiamento

---

Estádio 0:	Tis, N0, M0
Estádio I:	T1, N0, M0
Estádio II:	T2, N0, M0 T3, N0, M0
Estádio III:	T1, N1, M0 T2, N1, M0 T3, N1, M0 T4, N0, M0
Estádio IVa:	T4, N1, M0 Qualquer T, N2, M0
Estádio IVb:	Qualquer T, N3, M0
Estádio IVc:	Qualquer T, qualquer N, M1

---

O tratamento do câncer de boca deve ser bem planejado e executado com radicalidade a fim de trazer bons resultados estéticos, funcionais e de sobrevida.

Logo, deve-se levar em consideração a região anatômica comprometida, a extensão

do tumor primário, o envolvimento dos linfonodos cervicais e a presença de metástases à distância <sup>29, 30</sup>.

## **II.3 Fatores de risco**

### **II.3.1 Tabaco**

O tabagismo é considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a principal causa de morte evitável em todo o mundo. A OMS estima que um terço da população mundial adulta, isto é, um bilhão e 200 milhões de pessoas (entre as quais 200 milhões de mulheres), sejam fumantes. Pesquisas comprovam que aproximadamente 47% de toda a população masculina e 12% da população feminina no mundo fumam. Enquanto nos países em desenvolvimento os fumantes constituem 48% da população masculina e 7% da população feminina, nos países desenvolvidos a participação das mulheres mais do que triplica: 24% das mulheres têm o hábito de fumar e 42% dos homens (<http://www.who.int/topics/smoking/en/>).

As substâncias derivadas do tabaco são responsáveis pela morte de 4,9 milhões de pessoas por ano, o que equivale a dez mil mortes por dia. A fumaça do cigarro produz 4.720 substâncias já identificadas, das quais 81 são cancerígenas e muitas têm capacidade oxidante <sup>31,32</sup>.

O consumo de tabaco está correlacionado com o acúmulo de danos ao DNA. A exposição aos carcinógenos químicos do tabaco pode promover um efeito danoso no DNA das células da cavidade oral <sup>33, 34, 35</sup>.

Estudos têm demonstrado a forte correlação existente entre o câncer de boca e o uso crônico de tabaco. Segundo Neville e cols., o risco de câncer é dose dependente e está relacionado com o tipo de fumo que se faz uso, sendo que o

charuto e o cachimbo acarretam em um risco maior que o cigarro. O risco de desenvolver câncer de boca é 3 a 9 vezes maior naqueles indivíduos que fumam ou que consomem bebidas alcoólicas. E, é 100 vezes maior naqueles que consomem simultaneamente tabaco e álcool do que naqueles que não possuem esses hábitos<sup>36</sup>.

### **II.3.2 Álcool**

De acordo com dados epidemiológicos o consumo crônico de bebidas alcoólicas representa um risco aumentado para o desenvolvimento de cânceres da região orofaríngea<sup>37</sup>.

O consumo de bebidas alcoólicas tem repercussões em praticamente todo o organismo. Na cavidade oral surgem sinais e sintomas clínicos induzidos pelo efeito direto do álcool no organismo ou em consequência da associação desse hábito com uma higiene oral deficiente. Assim, em consumidores crônicos de bebidas alcoólicas encontra-se um maior índice de cáries, cálculos, bruxismo, leucoplasia e eritroplasia e, quando na presença de líquen plano, o álcool poderia estar envolvido na transformação maligna dessas lesões<sup>38, 39,40,41,42</sup>.

Existem múltiplas explicações que tentam elucidar o efeito promotor do álcool na carcinogênese, porém o mecanismo patogênico ainda não está claro. Isso se deve ao fato de o álcool por si só não ter demonstrado ser carcinogênico. Diversas hipóteses têm sido propostas para explicar como o etanol age como fator de risco no desenvolvimento do câncer, tanto local quanto sistêmico<sup>43</sup>.

O álcool quando em contato com a mucosa oral é capaz de produzir alterações morfológicas caracterizadas pela atrofia epitelial. Desta forma, tem-se sugerido que o etanol é capaz de aumentar a penetração de carcinógenos, devido

tanto a um aumento na solubilidade dos mesmos, como também a um aumento na permeabilidade das células da mucosa. Isso se explica pela capacidade solvente do etanol, que consegue eliminar o conteúdo lipídico da membrana celular. Alguns autores acreditam que esse aumento da permeabilidade se deve a um reordenamento dos elementos constituintes da membrana da célula <sup>44,45,46</sup>.

O aumento na permeabilidade da mucosa não é suficiente para explicar o maior risco de desenvolver câncer em bebedores crônicos de álcool, ainda mais porque o etanol por si só não tem demonstrado ser carcinogênico. Então, tem-se pesquisado o papel do acetaldeído, que é o primeiro produto metabólico do etanol. De acordo com Peter C. J., existe uma forte evidência de que o acetaldeído é carcinógeno em animais, sendo possivelmente também em humanos <sup>47</sup>.

### **II.3.3 Mate**

O mate ou chimarrão é uma bebida semelhante ao chá, elaborada a partir da erva *Ilex paraguayensis*, conhecida popularmente como erva-mate. Ele é consumido de forma rotineira em diferentes regiões da América do Sul, principalmente, na Argentina, no Uruguai e no Sul do Brasil e em menor quantidade na Alemanha, Síria, Líbano e norte de Israel. Seu consumo tem sido associado a um aumento do risco de desenvolvimento de neoplasias da cavidade oral e da orofaringe <sup>48,49</sup>.

Os mecanismos pelos quais o mate agiria como carcinógeno ainda não estão bem esclarecidos <sup>49</sup>.

Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, com o objetivo de correlacionar o espectro mutacional do gene *TP53* com fatores associados aos hábitos sociais locais, foram investigados 135 casos de carcinoma epidermóide de esôfago. Foi detectada alta prevalência de mutações do tipo transição (G>A e C >T)

relacionada à presença de nitrosamina. Considerando que a Região Sul do Brasil não é uma área onde alimentos contendo nitrosaminas tenham um papel relevante, a origem de compostos nitrosos foi associada a um processo endógeno. Este processo derivaria de uma inflamação crônica provocada pelo consumo de mate em temperatura elevada, sugerindo que o consumo de mate esteja implicado na gênese tumoral em função da hipertermia <sup>50</sup>. Esta associação da alta temperatura do mate e risco de câncer de esôfago também foi verificada no Uruguai em um trabalho experimental <sup>51</sup>, bem como no Paraguai <sup>52</sup>, na Argentina <sup>53,54</sup> e nos municípios de Pelotas e de Taquara, Rio Grande do Sul <sup>55, 56,57</sup>.

### **II.3.4 Agentes Virais**

Diversos vírus vêm sendo implicados na etiologia do carcinoma epidermóide de boca, são eles: o papiloma vírus humano (HPV), o Epstein-Baar (EBV) e o herpes simples <sup>5</sup>.

O HPV tem um importante papel na etiologia dos carcinomas de cabeça e pescoço, particularmente os de orofaringe <sup>58</sup>. Assim como no câncer cervical, o HPV está associado a lesões orais benignas e malignas. Nas lesões benignas e nas pré-neoplásicas o genoma do HPV é mantido numa forma epissômica (não integrada), ao passo que nos cânceres, o DNA viral é geralmente integrado ao genoma da célula hospedeira. Isso sugere que a integração do DNA viral é importante na transformação maligna <sup>21</sup>. Essa integração ocasiona uma alteração na regulação da expressão das proteínas virais E6 e E7, os quais podem exercer seus efeitos interagindo com as proteínas que regulam o crescimento celular <sup>58</sup>. Uma das proteínas em que o oncogene E6 pode se ligar é a p53, produto do gene supressor tumoral *TP53*. A ligação da proteína viral à p53 pode levar a uma aceleração na sua

degradação, permitindo que as células com DNA danificado se perpetuem, não sendo reparadas ou não sendo levadas à apoptose <sup>59</sup>.

### **II.3.5 Suscetibilidade genética**

Além dos fatores exógenos, devemos levar em consideração os fatores endógenos também responsáveis pelo aparecimento de câncer. A suscetibilidade genética é um exemplo de fator intrínseco que influencia no desenvolvimento de tumores malignos <sup>60</sup>.

Segundo Hart e cols., pacientes com câncer apresentam danos no DNA que podem ser resultado tanto do aumento da suscetibilidade a agentes mutagênicos, quanto da diminuição da capacidade de reparo celular <sup>60</sup>.

## **II.4 Bases Moleculares do Câncer**

O termo carcinogênese é utilizado para descrever uma série de eventos que ocorre levando a conversão de uma célula normal em célula cancerosa. Este termo, atualmente, é visto como um processo composto por múltiplas etapas seqüenciais, que vai desde iniciação até a promoção e progressão com invasão e metástase <sup>61</sup>.

A suscetibilidade genética e/ou a exposição a múltiplos tipos de agentes carcinogênicos, de forma concorrente ou seqüencial, são os responsáveis por desencadear o desenvolvimento desta patologia <sup>61</sup>.

A alteração da mensagem genética é essencial no processo de carcinogênese e pode ser causada por: mutações (pontuais e/ou cromossômicas), modificações epigenéticas ou interações proteína-proteína <sup>62</sup>.

Estima-se que, antes da detecção clínica de um câncer de cabeça e pescoço, esporádico, as células têm de ter sofrido no mínimo de 6 a 10 alterações genéticas independentes, que vão sendo adquiridas durante um período de latência de, em média, 20 a 25 anos. Durante esse período acredita-se que uma das causas predominantes dessas alterações seja a exposição a diversos carcinógenos <sup>63</sup>.

O acúmulo de mutações em classes específicas de genes de determinadas células podem desencadear a sua transformação neoplásica <sup>64</sup>. Mesmo em um ambiente livre de agentes que causem mutação, esta pode ocorrer espontaneamente durante a divisão celular. As mutações somáticas, que ocorrem em células isoladas, resultam de erros durante a replicação do DNA durante o ciclo celular ou de falhas dos mecanismos de reparo <sup>64, 65</sup>.

## **II.5 Gene Supressor de Tumor *TP53***

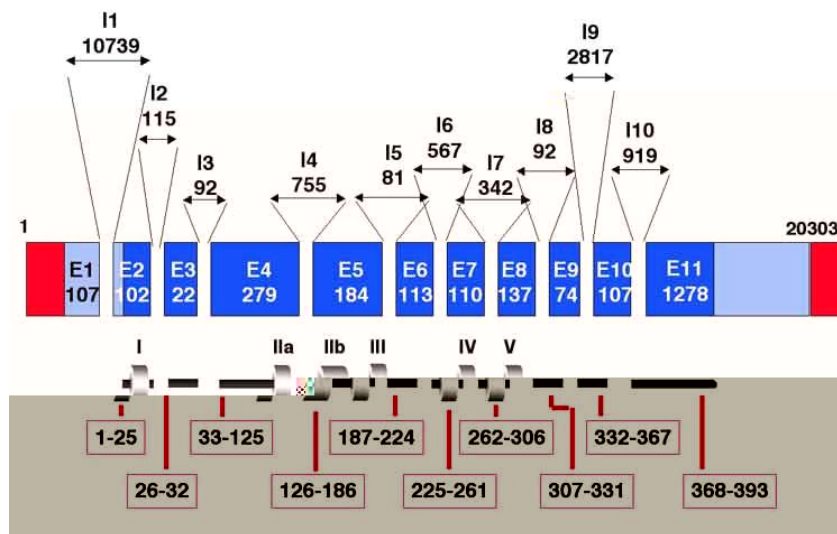
### **II.5.1 Considerações gerais**

O gene supressor tumoral *TP53* localiza-se no braço curto do cromossomo 17, na posição 17p13.1. Este gene é composto por 11 exons que codificam uma proteína, predominantemente nuclear, de 53 KDa, composta 393 aminoácidos, denominada de p53. O mesmo pertence a uma família de genes altamente conservados que contém, pelo menos, dois outros genes: *P63* e *TP73* <sup>66</sup>.

O gene *TP53* possui alto grau de conservação filogenética. O seqüenciamento desse gene revela cinco regiões altamente conservadas. Presume-se que as seqüências de aminoácidos, codificados por estas regiões, representem domínios essenciais para a função da proteína. Estes cinco domínios são conhecidos por I, II, III, IV e V e apresentam-se assim distribuídos: domínio I,



localizado entre os aminoácidos 13 e 19; domínio II, entre os aminoácidos 117 e 142; domínio III, entre os aminoácidos 171 e 181; domínio IV entre os aminoácidos 234 e 258; e, finalmente o domínio V entre os aminoácidos 270 e 286<sup>66,67,68</sup>.



**Figura 1.** Diagrama do gene *TP53* e da proteína p53. **A.** Representação dos 11 exons intercalados pelos 10 introns (os números indicam o tamanho no gene). **B.** Representação esquemática da proteína. Observam-se os domínios conservados (I a V) e o número de aminoácidos ([p53.free.fr/p53\\_Info/gene/p53GENE.html](http://p53.free.fr/p53_Info/gene/p53GENE.html)).

## II.5.2 Mutações no gene *TP53*

As mutações no gene *TP53* são encontradas em aproximadamente 50% dos cânceres humanos. A frequência dessas mutações varia de 5 a 50%, dependendo do tipo e estágio do tumor. Neoplasias malignas com alta frequência (40–55%) incluem o câncer de ovário, de esôfago, de intestino, de cabeça e pescoço e de pulmão<sup>68,69</sup>.

A maioria das mutações do gene *TP53*, ou seja, mais de 90% correspondem a mutações pontuais, somáticas adquiridas. As mutações pontuais do tipo *missense*, simples troca de um nucleotídeo por outro, podendo ser uma transição ou uma

transversão, levam a troca de um aminoácido na cadeia polipeptídica, representam cerca de 80% dessas mutações. Estas mutações produzem uma proteína com meia-vida aumentada que se acumula no núcleo das células, tornando-se facilmente detectável por meio de técnicas de imunohistoquímica<sup>68,69</sup>. Estas mutações ocorrem principalmente entre os códons 120 e 290, situados entre os exons 5 e 8 o que resulta, geralmente, na transcrição de uma proteína não funcional<sup>68,69,70</sup>.

Mais de 90% das mutações desse gene ocorrem na seqüência específica de ligação ao DNA no domínio central, na região dos exons 5, 6, 7, 8 e destas 50% estão relacionados aos códons 175, 248, 249, 273 ou 282 dentro desse domínio nas regiões chamadas de “hotspots”<sup>71</sup>.

As mutações quando avaliadas de acordo com o tipo de câncer apresentam importantes diferenças quanto ao padrão mutacional. Essas variações são tanto em relação à localização dos códons mutados quanto em relação à freqüência de transições e transversões<sup>72</sup>.

As mutações que se apresentam de diferentes formas e localizações e podem ser determinadas tanto por fatores exógenos quanto por eventos endógenos. As mutações de origem endógena são aquelas que resultam de erros que ocorrem durante os vários processos biológicos relacionados ao metabolismo do DNA e à sua replicação. Já as de origem exógena são aquelas que ocorrem em decorrência da ação de fatores ambientais<sup>73</sup>.

As mutações do gene *TP53* são comuns em muitos tipos de câncer e a sua distribuição pode servir como informação da natureza dos mecanismos mutagênicos, dando uma idéia da etiologia e da patogênese molecular dessa doença<sup>73</sup>.

Padrões específicos de mutações têm sido observados em estudos de populações expostas a altos níveis de mutagênicos. Exemplos bem documentados incluem o carcinoma hepatocelular em indivíduos cronicamente infectados pelo vírus

HBV e expostos a uma dieta rica em aflotoxinas, o câncer de pulmão em fumantes e o câncer cutâneo tipo não melanoma em indivíduos expostos aos raios UV. Em outros cânceres como de esôfago e de bexiga têm sido encontradas mutações específicas, porém os mutagênicos envolvidos ainda não estão bem claros <sup>69</sup>.

Nos tumores de cavidade oral, diferentes estudos observaram resultados inconclusivos com relação à exposição a mutagênicos conhecidos e ao espectro mutacional do gene *TP53*.

Mutações do tipo *frameshift* têm sido encontradas freqüentemente num subgrupo de pacientes expostos ao tabaco e ao álcool. É possível que a combinação do efeito desses dois fatores favoreça a formação de mutações desse tipo. Entretanto, ainda não existem evidências que suportem esta conclusão <sup>69</sup>.

Num estudo envolvendo uma população do Sul do Brasil que teve como objetivo determinar a freqüência e a distribuição das mutações do gene *TP53* em carcinomas espinocelulares de cavidade oral, foram encontradas mutações em 40% dos casos. A maioria dessas mutações (90,5%) foi do tipo *missense*, sendo que as transições foram mais freqüentes que as transversões. Neste estudo não foram observados padrões específicos de mutações associados ao estilo de vida dos pacientes <sup>74</sup>.

## **II.6 Proteína p53**

A proteína p53 é o produto do gene *TP53* sendo composta por 393 aminoácidos, possuindo uma formação estrutural típica da proteínas de transcrição <sup>75,76</sup>.

A proteína p53 funcional apresenta uma estrutura molecular tetramérica. Cada uma dessas subunidades é formada por cinco regiões que apresentam funções distintas:

- a) A região amino terminal, também conhecida por domínio de transativação ou domínio ácido, está relacionada à transativação de alguns genes como o p21, *RB1*, *Gadd45*, *bax*, *bcl2*, *Gmyc*, *MAP4*; tal região corresponde aos 42 aminoácidos iniciais que interagem com a maquinaria de transcrição basal, regulando a expressão gênica. Ela é alvo para, pelo menos, dois reguladores negativos da função do gene *TP53*, que são a proteína celular *MDM2* e o adenovírus E1b. É uma região extremamente imunogênica, contendo vários epítopos para diversos anticorpos anti-p53;
- b) a região rica em prolina, que consiste de cinco repetições de PXXP, onde P é prolina e X é qualquer aminoácido. Este domínio é exigido na apoptose e tem implicação na regulação negativa da p53. Ele situa-se entre os aminoácidos 60 e 92, marcando o início da região central hidrofóbica da proteína, e parece ser importante na manutenção da integridade estrutural da proteína;
- c) a região central, situada entre os aminoácidos 100 e 295, é responsável pela ligação ao DNA, reconhecendo pelo menos duas seqüências consenso de DNA, 5' – PuPuPu C(A/T)- (T/A)G PyPyPy – 3' e determina a conformação da proteína;
- d) a região de oligomerização, entre os aminoácidos 319 e 360, onde há a formação dos tetrâmeros, que é a forma que tipicamente se une às seqüências específicas de DNA;
- e) a região carboxiterminal, que também funciona como um domínio regulatório negativo<sup>75,76</sup>.

### **II.6.1 Ativação da proteína p53**

A p53 é expressa em quase todos os tecidos como uma proteína constitutivamente reprimida. Diversas classes de sinais são capazes de ativá-la provocando um aumento na sua concentração em função de modificações pós-tradução. Estes sinais incluem danos no DNA, ativação constitutiva de oncogenes, depleção de ribonucleotídeos e hipóxia <sup>66</sup>.

Uma vez ativada, a proteína p53 funciona como mediadora em uma série de efeitos antiproliferativos celulares regulando a transcrição ou modulando a atividade de proteínas que atuam no ciclo celular, no reparo do DNA, na apoptose, na diferenciação e na angiogênese <sup>75</sup>.

### **II.6.2 Detecção da proteína p53**

A concentração da proteína p53 nas células é determinada, principalmente, pelo índice em que é degradada, e não pelo índice em que é produzida. A p53 é degradada por uma via de proteólise dependente da ubiquitina. Uma das funções dessa via é conferir meia-vida curta para certas proteínas normais, cuja concentração deve variar precisamente com as alterações do estágio da célula. Em relação à p53, este mecanismo conta com a participação do produto do oncogene *MDM2*, via interação proteína-proteína <sup>75</sup>.

Nas células, em condições fisiológicas normais, a p53 é encontrada em baixos níveis e em estado latente, possuindo uma meia-vida de aproximadamente vinte minutos. Mutações no gene *TP53*, que resultam em modificações na estrutura primária da p53, levam a um alongamento da meia-vida da proteína permitindo a sua detecção por meio de técnicas de imunohistoquímica <sup>76</sup>.

### II.6.3 A proteína p53 e o câncer de boca

Segundo diferentes autores a detecção da proteína p53 por meio da técnica de IH ocorre em 34 a 100% dos cânceres de boca, com mutação detectada em 40 a 50% desses casos, sugerindo que a perda de função da p53 é um fator importante na gênese dessa patologia <sup>77,78,79,80,81,82,83</sup>.

Nogueira e cols. detectaram o acúmulo da proteína p53 em 55,0% dos carcinomas de cavidade oral, investigados em uma população do nordeste do Brasil <sup>84</sup>.

Alguns estudos relatam a discrepância entre a detecção da p53 por IH e a existência de mutação no gene *TP53* determinada pela técnica de seqüenciamento. Estas observações têm sido atribuídas, entre outras, à falta de sensibilidade dos protocolos de detecção das mutações e/ou à existência de mutações que levam à produção de uma proteína truncada <sup>77, 81, 85,86</sup>.

Segundo Cruz e cols., a reação positiva para a proteína p53 nem sempre reflete a presença de mutação, assim como a negativa não reflete necessariamente a sua ausência <sup>87</sup>.

### **III OBJETIVOS**

---

#### **III.1 Objetivo Geral**

Investigar a frequência e os tipos de mutações no gene *TP53* em espécimes cirúrgicos de carcinomas epidermóides de cavidade oral.

#### **III.2 Objetivos Específicos**

- Detectar o acúmulo da proteína p53, por meio da técnica de imunohistoquímica, em carcinomas epidermóides de cavidade oral;
- Determinar o espectro mutacional dos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*, por meio de seqüenciamento automático do DNA;
- Examinar a relação entre dados clínico-patológicos, fatores de risco (fumo, álcool e mate) com os resultados da IH e do seqüenciamento dos exons 5, 6, 7 e 8 do gene *TP53*.

#### **IV ASPECTOS ÉTICOS**

---

Esta pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa da ISCMPA (Parecer nº 111/03) e da FFFCMPA (Parecer nº 042/05). Todos os participantes do estudo foram voluntários e assinaram o Termo de Consentimento Informado (Anexo E).



## V REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Mao L, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Focus on Head and neck cancer. *Cancer Cell* 2004; 5: 311-316.
2. Parkin DM, Pisani P, Ferlovoy J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999; 80: 827-41.
3. Instituto nacional do Câncer – INCA. Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa da Incidência e Mortalidade por câncer no Brasil, 2006. Disponível: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>. Acesso em: maio 2006.
4. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253: 49-53.
5. Wünsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002; 38: 737-46.
6. Parkin DM, Whelan SL, Ferlovoy J, Raymond L, Young J. Cancer incidence in five continents, vol VII (IARC Scientific Publications n° 143). Lyon: IARC, 1997.
7. Wünsch-Filho V, Camargo EA. The burden of mouth cancer in Latin America and the Caribbean: epidemiologic issues. *Seminars Oncol* 2001: 158-68.
8. Jemal A, Tiwari RC, Murria T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004;54(1): 8-29.
9. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 1890-1900.

10. Nemeth Z, Velich N, Bogdan S, Ujpal M, Szábo G, Suba Z. The prognostic role of clinical, morphological and molecular markers in oral squamous cell tumors. *Neoplasma* 2005; 52(2): 95-102.
11. Chen J, Katz RV, Krutchkoff DJ. Intraoral squamous cell carcinoma: epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. *Cancer* 1990; 66(6):1288-96.
12. Erisen L, Basut O, Tezel I, Onart S, Arat M, Hizalan I, Coskun H. Regional epidemiological features of lip, oral cavity, and oropharyngeal cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1996; 15(2-4): 225-9.
13. Araujo Filho VJ, De Carlucci Junior D, Sasaki SU, Montag E, Azato FN, Cordeiro AC, Ferraz AR. Perfil de incidência do câncer oral em um hospital geral de São Paulo. *Rev Hosp Clin Fac Méd São Paulo* 1998; 53 (3): 110-3.
14. Venturi BRM, Pamplona ACF, Cardoso AS. Carcinoma de células escamosas da cavidade oral em pacientes jovens e sua crescente incidência: revisão de literatura. *Rev Bras Otorrinolaring* 2001; 70(50): 679-686.
15. Oliver RJ, Dearing J, Hindle I. Oral cancer in young adults: report of three cases and review of the literature. *Br Dent J* 2000 Apr 8; 188(7): 362-5.
16. Mc Gregor GI, Davis N, Robins RE. Squamous cell carcinoma of the tongue and lower oral cavity in patients under 40 years of age. *Am J Surg* 1983; 146: 88-92.
17. Clarke R W, Stell P M. Squamous carcinoma of the head and neck in the young adult. *Clin Otolaryngol* 1992; 17: 18-23.
18. Siegelmann-Danieli N, Hanlon A, Ridge JA, Padmore R, Fein DA, Langer CJ. Oral tongue cancer in patients less than 45 years old: institutional experience and comparison with older patients. *J Clin Oncol* 1998, 1: 745-753.

19. Atula S, Grenman R, Laippala P, Syrjänen S. Cancer of the tongue in patients younger than 40 years. A distinct entity? *Arc Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122: 1313-19.
20. Cotran RS. Head and neck. Squamous cell carcinoma. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T (eds), *Robbins Pathologic basis of disease*, pp 760-1. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 6<sup>th</sup> edition, 1999.
21. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial*, pp 798. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2<sup>a</sup> Edição, 2004.
22. Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P., Sidransky, D. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO Classification of Tumours, Volume 9*, 2005.
23. Oreggia F, De Stefani E, Correa P, Fierro L. Risk factors for cancer of the tongue in Uruguay. *Cancer* 1991; 67(1): 180-3.
24. Liewelyn J, Mitchell R. Smoking, alcohol and oral cancer in South East Scotland: a 10-year experience. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1994; 32(3): 146-52.
25. Antoniades KZ, Styaniadis K, Papanayotou P, Trigonidis G. Squamous cell carcinoma of the lips in a northern Greek population. Evaluation of prognostic factors on 5-year survival rate. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31(5): 333-9.
26. Muir C, Weiland L. Upper aerodigestive tract cancers. *Cancer* 1995; 75(1): 47-53.
27. Birman E G, Sugaya NN. Diagnóstico diferencial / Differential diagnosis. In: Parise Junior, O. *Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos*. São Paulo, Sarvier, 2000. p.80-6, ilustr. (BR).
28. Califano J, Leong PL, Koch WM, Eisenberger CF, Sidransky D, Westra WH. Second esophageal tumors in patients with head and neck squamous cell

- carcinoma: an assessment of clonal relationships. Clin Cancer Res 1999; 5(7): 1862-7.
29. Carvalho MB. Tratamento e prognóstico dos tumores malignos de cavidade oral. In: Tratado de cirurgia de cabeça e pescoço e otorrinolaringologia. São Paulo, Atheneu, 2001. p 309-321.
  30. Mitteldorf, CATS. Anatomia patológica no câncer de boca. In: Parise Junior, O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo, Sarvier, 2000. p.96-100. (BR).
  31. World Health Organization. Addressing the Worldwide Tobacco Epidemic through Effective Evidence-Based Treatment. Expert Meeting March 1999, Rochester, Minnesota, USA Tobacco Free Initiative, WHO 2000
  32. Li FP. Familial aggregation. In: Schottenfeld D, Fraumeni Jr JF, editors. Cancer Epidemiology and prevention. New York: Oxford University Press, 1996. p.546-58.
  33. Park N, Kang MK. Genetic instability and oral cancer. Eletron J Biotech 2000; 15(3): 66-71.
  34. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 2002; 128: 268-274.
  35. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. Cancer Res 1994; 54: 4855-78.
  36. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. CA Cancer J Clin 2002; 52: 195-215.
  37. Paolo B & Hashibe M. Alcohol and cancer The Lancet Oncology, 2006 Vol 7(2): 149-156

38. Homann N, Jousimies H, Jokelainen K, Heine R, Salapuro M. High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption; methodological aspects and pathogenic implications. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1739-43.
39. López-Jiménez J, Giménez PMJ, Boj Quesada JR, Caballero HR. Alcoholismo: consideraciones estomatológicas. *Archivos de Odontoestomatología* 1999; 15: 391-7.
40. Shukla S, Sun G, Gibson W, Savolainen MJ, Alling C, Hoek JB. Ethanol and lipid metabolic signaling alcoholism. *Clinical and Experimental Research May Supplement* 2001; 25: 33-9.
41. Scott J, Burns J, Flowr EA. Histological analysis of parotid and submandibular glands in chronic alcohol abuser: a necropsy study. *J clin Pathol* 1988; 41: 837-40.
42. Hashibe M, Sankaranarayanan R, Thomas G, Kuruvilla B, Mathew B, Somanathan T. Alcohol drinking, body mass index and the risk of oral leukoplakia in an Indian population. *Int J Cancer* 2000; 88: 129-34.
43. Franceschi S, Talamini S, Barra S, Baron A, Negri E, Bidoli E. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx an esophagus in northern Italy. *Cancer Res* 1995; 50: 6502-7.
44. Ogden GR, Wight AJ. A etiology of oral cancer: alcohol. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1998; 36: 247-51.
45. Trigkas TK, Cruchley AT, Williams DM, Wertz P, Squier. Humam oral mucosal permeability is increased by short-term exposure to ethanol. *J Dental Research* 1993; 72: 694.
46. Howie N M, Williams D M. The effect of ethanol on the permeability of oral mucosa to albumin and sucrose. *J Dental Research* 1995; 74: 889.

47. Peter CJ. The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (Update 2000) *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 2001; 25: 15-32.
48. Vasquez A, Moyna P. Studies on mate drinking. *J Ethnopharmacol* 1986; 18: 267-272.
49. Goldenberg D. Maté:a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Onc* 2002; 38: 646-649.
50. Pütz a, Hartmann AA, Fontes PRO, Alexandre COP, Silveira DA, Klug SJ, Rabes HM. *TP53* mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high-risk area (Southern Brazil):Role of life style factors. *Int J Cancer* 2002; 98: 99-105.
51. Candreva EC, Keszenmann DJ, Barrios E, Gelos U, Nunes E. Mutagenicity induced by hypertermia, hot mate infusión, and hot caffeine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cancer Res* 1993; 53(23): 5750-3
52. Rolon PA, Castellsague X, Benz M, Munoz N. Hot and cold mate drinking and esophageal cancer in Paraguay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1995; 4(6): 595-605.
53. Castelletto R, Castellsague X, Munoz N, Iscovich J, Chopita N, Jmelnitsky A. Alcohol, tobacco, diet, mate drinking, and esophageal câncer in Argentina. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3(7): 557-64.
54. Munoz SE, Chatenoud L, La Vecchia C, Negri E, Levi F. Trends in cancer mortality in Argentina, 1966-91. *Eur J Cancer Prev* 1998; 7(1): 37-44.
55. Victora CG, Munoz N, Day NE, Barcelos LB, Peccin DA, Braga NM. Hot beverages and esophageal cancer in southern Brazil: a case-control study. *Int J Cancer* 1987; 39(6): 710-6.
56. Victora CG, Munoz N, Horta BL, Ramos EO. Patterns of mate drinking in an Brazilian city. *Cancer Res* 1990; 50(22): 7112-5.

57. Barros SGS, Ghisolfi ES, Luz LP, Barlem GG, Vidal RM, Wolf FH, Magno VA, Breyer HP, Dietz J, Grüber AC, Krueel CDP, Prolla JC. Mate (chimarrão) é consumido em alta temperatura por população sob risco para o carcinoma epidermóide de esôfago. *Arq Gastroenterol* 2000; 37(1): 25-30.
58. Stina S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer *Journal of Clinical Virology*, 2000; 32(Supp1): 59-66
59. Portugal LG, Goldenberg LD, Wenig BL, Ferrer LT, Nodzenski E, Sabnani JB, Javier C, Weichselbaum RR and Vokes. Human papillomavirus expression and p53 gene mutations in squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123(11): 1230-1234.
60. Hart AK, Karakla DW, Pitman KT, Adams JF. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: report on 13 cases and review of the literature. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 120(6) 828-33.
61. Califano J, Van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W and Sidransky D. genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*, 1996; 56: 2488-2492.
62. Baak JPA, Path FRC, Hermsen MAJA, Meijer G, Schmidt J, Janssen EAM. Genomics and proteomics in cancer. *European J. of Cancer* 2003; 39: 1199-1215.
63. Califano J, Westra W, Koch W, Meininger G, Reed A, Yip L, Boyle JO, Lonardo F, Sidransky D. Unknown primary head and neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(7): 599-604.
64. Weinberg RA. The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol Ther* 1996; 2(2): 105-10.

65. Bishop JM. Molecular themes in ocogenesis. *Cell* 1991; 64: 235-248.
66. Guimarães DP, Hainaut P. *TP53*: a key gene in human cancer. *Biochimie* 2002; 84: 83-93.
67. Cadwell C and Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 2001; 277: 15-30.
68. Soussi T, Bérout C. Assessing *TP53* status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(3): 233-40.
69. Moura Gallo CV, Silva Mendonça GA, Moraes E, Olivier M, Hainaut P. *TP53* mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin América: Current knowledge and perspectives. *Mut Res* 2005; 589: 192-207.
70. Soussi T, Bérout C. The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum Mutat* 2003; 21(3): 176-81.
71. Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331(3): 834-42.
72. Sidransky D and Hollstein M. Clinical implications of the p53 gene. *Ann Rev Med* 1996;47: 285-301.
73. Barnard D, Lehmann K, Hoal EG, Van Helden PD, Victor TC. The spectrum of mutations in *TP53* in laryngeal cancer patients from a high-incidence population shows similarities to many of the known mutational hotspots. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 2003,145: 126-132.
74. Chaves ACM, Cherubini K, Herter NT, Furian R, Santos DS, Squier C, Domann F. Characterization of p53 gene mutations in a Brazilian population with oral squamous cell carcinomas. *Int. J Oncol.* 2004; 24: 295-303
75. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408(6810): 307-10.



76. Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(1): 68-76.
77. Shildt EB, Nylander K, Eriksson M, Hardell L, Magnusson A, Roos G. Expression of p53, PCNA, Ki-67 and bcl-2 in relation to risk factors in oral cancer- a molecular epidemiological study. *Int J Oncol* 2003; 22: 861-68.
78. Langdon JD, Partridge M. Expression of the tumor suppressor gene p53 in oral cancer. *Br J Oral Maxil Surg* 1992; 30: 214-220.
79. Warnakulasuriya KAAS, Johnson NW. Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 404-408.
80. Field JK, Spandidos DA, Malliri A, Gosney JR, Yiagnosis M and Stell PM. Elevated p53 expression correlates with a history of heavy smoking in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Cancer* 1991; 64: 573-77.
81. Ahomadegbe JC, Barrois M, Fogel S, Le Bihan ML, Douc-Rasy S, Duvillard P, Armand JP and Riou G. High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumours and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. *Oncogene* 1995; 10: 1217-27.
82. El-Naggar AK, Lai S, Luna MA, Zhou XD, Weber RS, Goepfert H and Batsakis JG. Sequential p53 analysis of pre-invasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Int J Cancer* 1995; 64: 196-201.
83. Partridge M, Kiguwa S, Emilion G, Pateromichelakis S, Hern RA. New insights into p53 protein stabilization in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999; 35: 45-55.

84. Nogueira LM, Lima GM, Rabenhorst SHB, Ferreira VA. Detecção da p53 em lesões benignas e malignas da mucosa bucal: correlação com o hábito de fumar. Rev. de Cir. e Traumat. Buco-Maxilo-facial 2004; 4(1): 33-62
85. Li Y-Q, Pavelic ZP, Wang LJ et al. Altered p53 in microdissected, metachronous, premalignant and malignant oral lesions from the same patients. J Clin Pathol: Mol Pathol 1995; 48: 269-272.
86. Xu L, Chen Y-T, Huvos AG et al. Over-expression of p53 protein in squamous cell carcinoma of head and neck without apparent gene mutations. Diagnostic Molecular Pathology 1994; 3: 83-92.
87. Cruz I, Snijders PJF, Houten VV, Vosjan M, Van der Waal M, Meijer CJLM. Specific p53 immunostaining in patients with oral squamous cell carcinomas. J Clin Pathol 2002; 55: 834-840.

## **VI ARTIGO CIENTÍFICO**

---

### **VI.1 Título**

Mutações no gene *TP53* em carcinomas de cavidade oral: características clínico-patológicas e associação com fatores de risco na população do RS.

### **VI.2 Autores**

Juliane Cristina Silva de Azevedo, Ana Paula Frazzon, Andrea Pires Souto Damin, Graziela Agnes, Mariana Cristina Silva de Azevedo, Antonio Atalábio Hartmann, Claudio Osmar Pereira Alexandre.

### **VI.3 Resumo**

O câncer da cavidade oral está entre as seis neoplasias mais comuns em homens no Estado do Rio Grande do Sul (Brasil), representando um importante problema de saúde pública. Com o objetivo de identificar a frequência e os tipos de mutação no gene em carcinomas epidermóides de cavidade oral e possíveis associações com o estilo de vida dos pacientes, foram analisados 40 casos por meio da técnica imunohistoquímica (IH). Posteriormente, o DNA dos 23 casos tiveram os exons 5, 6, 7 e 8, do gene , seqüenciados. A amostra foi composta por indivíduos de ambos os sexos, com predominância do sexo masculino (3,4:1) e idade média de  $55,7 \pm 15,1$  anos. Do total de casos, 62,5% apresentavam o tumor localizado na língua, sendo 55,0% classificados no estágio IV. A IH detectou o acúmulo da

proteína p53 em 72,5% dos casos. Entre os 23 casos seqüenciados foram encontradas 13 mutações, sendo 6 transversões, 5 transições e 2 inserções, configurando-se 8 do tipo *missense*, 3 silenciosas e 2 *frameshift*. O maior número de mutações foi encontrada no exon 6 (46,2%). Entre as mutações, 23,0% estão localizadas em códons denominados de *hotspots*. Embora a mutação no gene seja um evento freqüente nos tumores de cavidade oral, não foram encontradas associações estatisticamente significativas em relação aos fatores de risco investigados.

Palavras-chave: carcinoma de cavidade oral, mutação, IH, seqüenciamento.

#### **VI.4 Introdução**

O carcinoma epidermóide ou escamoso corresponde a aproximadamente 90% dos tumores encontrados na cavidade oral <sup>1</sup>. A média de incidência anual e as taxas de mortalidade, entretanto, variam consideravelmente entre as diferentes raças, sexo, grupos etários e região geográfica. Assim como em outros carcinomas, o risco aumenta com a idade, tendo um aumento na incidência na sexta década de vida. O sexo masculino é o mais acometido <sup>2</sup>. No Brasil, a estimativa de incidência para o ano de 2006 foi de 10,91/100000 homens e 3,93/100000 mulheres, sendo o Estado do Rio Grande do Sul o de maior número de casos da região Sul <sup>3</sup>.

A etiologia do carcinoma de cavidade oral é multifatorial. Não há um único fator carcinógeno, mas sim, a interação de fatores extrínsecos e intrínsecos nos indivíduos acometidos <sup>3</sup>.

As mutações no gene são encontradas em aproximadamente 50% dos cânceres humanos. Neoplasias malignas com alta freqüência (40–55%) incluem o câncer de ovário, de esôfago, de intestino, de cabeça e pescoço e de pulmão <sup>4</sup>.

A distribuição das mutações no gene pode servir como informação da natureza dos mecanismos mutagênicos, sugerindo a etiologia e a patogênese molecular dessa doença <sup>4</sup>.

No presente estudo examinamos a frequência e a distribuição das mutações no gene em indivíduos com carcinoma da cavidade oral e a possível relação com os fatores de risco, álcool, fumo e mate.

## **VI.5 Material e Métodos**

Foram avaliados pacientes com diagnóstico confirmado de CECO submetidos à cirurgia de ressecção tumoral no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCOMPA) durante o período de junho de 2003 a junho de 2004. Os pacientes responderam a um questionário, previamente estruturado, onde foram registrados fatores como idade, gênero, profissão, procedência e hábitos de fumar, ingerir bebidas alcoólicas e mate. Os dados clínico-patológicos foram obtidos por meio dos prontuários.

### **Espécimes**

Os espécimes cirúrgicos foram fixados e embebidos em parafina no Laboratório de Patologia da ISCOMPA. De cada bloco de parafina foram extraídos cortes histológicos seriados na seguinte ordem: um corte de 3 $\mu$ m de espessura distendido em lâmina de vidro sem aditivos, destinado à coloração de rotina HE; um corte de 3  $\mu$ m, distendido em lâmina de vidro silanizada, destinado à técnica de imunohistoquímica (IH); e, dois cortes de 10 $\mu$ m, distendidos em lâmina de vidro sem aditivos, destinados à biologia molecular.

## **Imunohistoquímica**

Os cortes, desparafinados em xilol e re-hidratados em diferentes concentrações de etanol, foram submetidos à reativação antigênica com solução de citrato de sódio pH 6,0 e incubados com o anticorpo murino primário “Anti-human p53 protein” (clone DO-7, DAKO, Carpinteria, USA) na concentração 1:20. A seguir, a detecção do anticorpo primário foi realizada com o kit *LSAB+ Detection System*, de acordo com as instruções do fabricante (DAKO, Carpinteria, USA).

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Olympus Bx40) acoplado a equipamento de análise digital de imagens (LEICA Q500MC).

Foram considerados positivos os tumores com coloração amarronzada nuclear, utilizando-se como critério de positividade para as lâminas um valor mínimo de 5%, contando-se em 10 campos de maior aumento (400x) um total de 1000 células.

## **Isolamento do DNA**

A lâmina seriada com corte de 10µm de espessura foi sobreposta à lâmina de HE onde foi previamente demarcada a área tumoral. Com uma lâmina de bisturi estéril foi feita a raspagem do material delimitado, o qual foi acondicionado em pequenos tubos de polipropileno com tampa. O DNA de 23 amostras de tecido, selecionadas aleatoriamente, foi extraído com a utilização do Kit da NucleoSpin® (Macherey & Nagel, Solana Beach CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, a parafina foi removida utilizando-se lavagens sucessivas com 1ml de xilol e 1ml de álcool absoluto. Após a última lavagem as amostras foram mantidas a 37°C durante aproximadamente 15min. Para a lise celular, as amostras foram incubadas a 55°C numa solução tamponada de proteinase K e deixadas *overnight*. Em seguida, as amostras foram lavadas e

submetidas à filtração em membrana de sílica. O DNA foi eluído em 80µl de tampão de eluição e estocado a -20°C.

### **Seqüenciamento automático do DNA**

Todas as 23 amostras de DNA foram submetidas a uma reação de amplificação por PCR (Polymerase Chain Reaction) com o uso de primers específicos para os exons 5, 6, 7 e 8 do gene (Tabela 3 - Anexo C).

A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada com o equipamento Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Cada reação de amplificação foi realizada em um volume total de 50µl e continha 20mM Tris-HCL (pH 8,4), 50mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,0 U de Taq DNA polimerase Platinum (para a reação do exon 6 foi usado 1,5U), 0,2mM de cada dNTP, 20pmol de cada primer (para o exon 6 foi usado 40pmol) e de 50-100ng de DNA extraído de cada amostra. A PCR foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min e uma etapa de extensão final a 72°C por 10min. As etapas seguintes foram específicas para cada exon, de acordo com Pütz e cols <sup>5</sup>. O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. Controles negativos e positivos foram utilizados em cada reação de amplificação.

A análise da seqüência dos fragmentos dos exons 5, 6, 7, 8 foi realizada utilizando o BigDye® Terminator V3.1 Cycle sequencing reaction kit (Applied BioSystems, Foster City, CA) no seqüenciador automático ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied BioSystems) de acordo com as instruções do fabricante.

## **VI.6 Análise Estatística**

A análise descritiva dos dados foi realizada por meio do cálculo da média, desvio padrão e do teste exato de Fisher, teste qui-quadrado (acompanhado dos resíduos ajustados padronizados).

## **VI.7 Resultados**

Conforme podemos verificar na Tabela 4 (anexo C), a média de idade dos 40 casos investigados foi  $55,7 \pm 15,1$  anos, com um predomínio de indivíduos do sexo masculino (3,4:1). Um significativo percentual de pacientes referiu o consumo de fumo (70,0%), álcool (67,5%) e mate (85,0%), sendo que o relato de um período de exposição superior a 20 anos foi registrado por 85,7% dos fumantes, 74,1% dos indivíduos com hábito de ingerir bebidas alcoólicas e por 75,6% daqueles com hábito de ingerir mate. Em 55% dos casos houve uso concomitante de fumo, álcool e mate (Tabela 5 – Anexo C).

Com relação aos dados clínico-patológicos as amostras foram classificadas, em sua maioria, como carcinomas moderadamente diferenciados (42,5%), localizando-se, em 62,5% dos casos, na língua de forma isolada ou em associação com o soalho da boca (5%). A maioria dos pacientes (55,0%), apresentava tumores no estágio IV, ou seja, com doença avançada.

A análise imunohistoquímica detectou o acúmulo nuclear da proteína p53 em 72,5% dos casos estudados (Figuras 2 e 3 - Anexo C).

Relacionando os achados de positividade para a p53 com os dados clínico-patológicos, não encontramos diferenças estatisticamente significativas. Da mesma forma, não foram encontradas associações significativas com relação aos fatores de risco selecionados (Tabela 6 – Anexo C).



A tabela 7 (anexo C) mostra a distribuição das mutações observadas no gene. Dos 23 tumores seqüenciados, 11 apresentaram mutações. Dois casos apresentaram mais de uma mutação: o caso nº 3 com uma transversão e uma transição e o caso nº 4 com 2 transversões.

Em três amostras observamos que a troca de nucleotídeo, no respectivo códon, não resultou em mudança na seqüência de aminoácidos da proteína.

As mutações distribuíram-se de forma desigual entre os exons. Foi detectado um maior número de mutações no exon 6 (46,2%).

O tipo de mutação mais freqüente foi *missense* (61,5%). O restante correspondeu a 3 mutações silenciosas e 2 inserções (*frameshift*).

Em relação à distribuição nos exons diversos códons foram afetados. Três mutações foram encontradas no códon 213. Duas mutações no códon 273, uma transversão e uma inserção. Os demais códons 148, 164, 200, 210, 215, 237, 248 e 281 tiveram uma mutação cada. Três mutações afetaram códons definidos como *hotspots* (248 e 273).

A freqüência e os tipos de mutações detectadas não mostraram associações com nenhum dos fatores de risco investigados.

## **VI.8 Discussão**

No presente trabalho foram investigados 40 casos de carcinomas de cavidade oral provenientes de cirurgias para ressecção tumoral realizadas no Hospital Santa Rita (ISCOMPA) considerado como centro de referência em nossa região. A maior proporção de indivíduos do sexo masculino (3,4:1) e a idade média dos pacientes (55,7 anos) está de acordo com dados da literatura<sup>6,7</sup>. Por outro lado, em nossa amostra 6 pacientes (15,0%) tinham idade inferior a 45 anos. Na literatura a

ocorrência de casos de carcinoma de cavidade oral nesta faixa etária é incomum, variando de 0,24% a 9,0 %<sup>8</sup>. Não encontramos uma justificativa para a maior frequência de indivíduos jovens observada em nossa amostra, creditando esta diferença a um desvio em função do reduzido número de pacientes investigados.

No que se refere às informações epidemiológicas, podemos observar em nossos dados, a presença significativa de pacientes tabagistas (70,0%), com hábito de ingerir álcool (67,5%) e com o hábito de sorver mate (85,0%) sendo que, em geral, mais de 70% deles referiu um tempo de exposição superior a 20 anos. O tabagismo e/ou o hábito de ingerir bebidas alcoólicas são considerados fatores de risco já bem estabelecidos para este tipo de tumor, embora o consumo de mate seja ainda controverso<sup>3,9</sup>. É interessante assinalar que, entre os 6 pacientes com idade inferior a 45 anos, 4 referiam apenas o hábito de tomar mate com um tempo de exposição que variou de 7 a 19 anos.

Mesmo considerando o reduzido número destes pacientes, esta observação vai ao encontro do relato de diferentes autores, que sugerem que outros fatores de risco, além do álcool e do tabaco estejam associados à ocorrência do carcinoma oral em indivíduos jovens<sup>8,9</sup>.

Em relação aos dados clínico-patológicos, a maioria dos pacientes apresentava-se no estágio IV (55,0%), ou seja, com doença avançada, salientando que todos os casos tinham indicação para ressecção cirúrgica. Estudos referem que o câncer de cavidade oral, no Brasil, é tratado mais tardiamente, sendo que a maioria dos pacientes que chega aos hospitais apresentam tumores nos estágios avançados<sup>3,10</sup>.

O acúmulo da proteína p53 que pode refletir, de modo geral, a ocorrência de alterações na estrutura primária da molécula, foi detectado em 72,5% dos casos. Este resultado está de acordo com os valores obtidos por outro estudo, cuja

amplitude variou de 40% a 78,9%, confirmando a alta prevalência de alterações desta proteína em carcinomas da cavidade oral <sup>11</sup>.

O papel da proteína p53, como fator prognóstico isolado, é ainda controverso. Alguns estudos não observaram associação entre a detecção da proteína p53 e idade, localização do tumor, estágio ou diferenciação histológica <sup>11,12,13</sup>. Por outro lado, há estudos que relatam uma significativa associação entre acúmulo da p53 e diferenciação histológica <sup>14,15</sup> e o status linfonodal <sup>16</sup>. Nossos resultados não mostraram associação significativa entre a mutação da proteína p53, detectada pela técnica de IH, e os dados clinico-patológicos analisados.

Estudos sobre a associação do acúmulo da proteína p53 e fatores de risco como o hábito de fumar ou de ingerir bebidas alcoólicas tem produzido resultados inconsistentes <sup>11, 17, 18, 19, 20,21</sup>.

Nogueira e cols. investigando 34 pacientes com carcinoma da cavidade oral do nordeste do Brasil, observaram uma correlação significativa entre a expressão da p53 e o hábito de fumar <sup>11</sup>. Chiang e cols.<sup>17</sup> e Yan e cols. <sup>20</sup> observaram uma frequência mais alta de indivíduos com reação positiva a p53 entre não-fumantes e não adeptos do uso de betel (folha do vegetal *Piper betle* consumidos na Índia e partes do Sudeste da Ásia) quando comparados aos que possuíam os dois hábitos. Field e cols.<sup>18</sup> encontraram correlação entre o acúmulo da p53 e a história de consumo intenso de cigarros, mas não com a de consumo intenso de bebidas alcoólicas.

Matthews e cols.<sup>19</sup> não observaram associação entre o acúmulo da p53 e o hábito de fumar ou ingerir bebidas alcoólicas, analisados tanto como hábitos concomitantes ou como hábitos isolados, em 40 pacientes holandeses com carcinoma da cavidade oral. Kerdpon e cols.<sup>21</sup> observaram uma tendência à associação inversa entre o acúmulo da p53 e o tempo de exposição ao tabaco ou ao

betel e a associação positiva com o tempo de exposição a bebidas alcoólicas, em pacientes da Tailândia.

Em nosso estudo, não observamos associação entre o acúmulo da p53 e os fatores de risco investigados.

Os resultados inconclusivos observados, quando comparamos os diferentes estudos podem ser, em parte, creditados às próprias limitações da técnica de IH. A detecção do acúmulo nuclear da proteína p53 baseia-se na propriedade da proteína de que quando mutada tornar-se estável ao contrário da p53 nativa, que é instável, e não oferece condições de ser detectada pela técnica em questão <sup>22</sup>. Contudo a presença ou a ausência de concentrações detectáveis da p53 pode ser determinada por outros fatores. A estabilização da proteína p53 pode ser causada pela interação com a proteína E6 expressa pelos vírus HPV16 ou HPV18 <sup>23</sup>. A alteração na atividade da proteína MDM2 pode prejudicar a via de degradação da p53, resultando no acúmulo nuclear da mesma <sup>24</sup>. A presença de mutações *nonsense* pode levar a expressão de uma proteína truncada e não detectável pelo método imunológico <sup>25,26</sup>.

O seqüenciamento dos exons 5-8 do gene, em 23 amostras, revelou mutações em 11 casos, sendo que, em três deles, a mutação detectada foi do tipo silenciosa, ou seja, não produziu alteração na seqüência de aminoácidos da proteína. Em razão deste fato, devemos considerar que em apenas 9 casos (39,1%) houve alteração na estrutura primária da proteína. Observamos, deste modo, uma forte discrepância entre os valores obtidos pela técnica de IH (72,5%) e pelo seqüenciamento direto do DNA (39,1%).

Como já foi mencionado, a técnica de IH apresenta várias limitações que podem levar a desvios significativos <sup>26</sup>. Por outro lado, Soussi & Bérourd<sup>25</sup> mostraram que, em mais de 1.200 publicações, apenas 14% delas analisaram o segmento inteiro do gene, (exceto o exon 1) e indicaram que o foco nos exons 5-8 pode levar a

falsas conclusões, já que 13,6% das mutações foram localizadas fora dos citados exons. Um significativo número de mutações foi detectada nos exons 4, 10 e em menor número no exon 9.

O espectro mutacional revelou-se amplo e a análise detectou como era esperado, alterações em códons que são freqüentemente mutados, como por exemplo, os códons 248 e 273, que juntamente com o códon 175 são responsáveis por 19% de todas as mutações descritas no **IARC Mutation Database** (<http://www-p53.iarc.fr/>). Cabe assinalar que, em nosso estudo, estas duas mutações: 248 (*missense*) e 273 (*frameshift*) foram detectadas em dois pacientes com idades de 25 e 28 anos que não referiram o uso de fumo ou de bebidas alcoólicas. A primeira mutação mostrou-se um evento típico dos sítios *hotspots* CpG, sugerindo a influência de fatores endógenos derivados do próprio metabolismo celular (mutação espontânea). Neste caso a base citosina na posição 5' tende a ser modificada transformando-se em 5-metilcitosina e a seguir pode sofrer uma perda espontânea do radical amino (NH<sub>2</sub>) e transformar-se na base timina, provocando uma transição C>T<sup>27</sup>. Já segunda mutação, uma inserção, embora localizada em sítio *hotspots*, foi detectada em apenas 2% dos tumores de cavidade oral, não sendo descrita nenhuma associação específica a este evento (IARC Mutation Database).

Hsieh e cols.<sup>27</sup>, investigando 187 pacientes com câncer da cavidade oral em Taiwan, utilizando a técnica de SSCP e seqüenciamento direto do DNA dos exons 5-9 do gene detectaram mutação em 48,66% dos casos. A incidência da mutação não mostrou associação com parâmetros clínico-patológicos e nem com os hábitos de fumar ou de mascar betel. Entretanto, entre os consumidores de álcool houve uma incidência significativamente maior de mutações quando comparada aos que não referiam o hábito de ingerir bebidas alcoólicas. O espectro mutacional revelou uma

predominância de transições G:C>A;T associada ao uso de fumo e consumo de betel, contudo devemos considerar que 62,5% destas mutações localizavam-se em sítios hotspots CpG.

Yamazaki e cols.<sup>28</sup> analisando os exons 5-8 do gene em material fresco de biópsia ou ressecção cirúrgica de 121 pacientes de Hokkaido (Japão) pela técnica de SSCP e seqüenciamento direto do DNA, não observaram correlação significativa com os parâmetros clínico-patológicos. Foi detectada mutação em 42% dos casos com uma predominância de transições G:C>A:T, a maioria delas localizadas no sítio CpG.

É interessante assinalar que no nosso estudo foram detectadas 38,4% das mutações nos mesmos códons (148, 213, 237, 248, 273) identificados nestes dois estudos já citados, contudo o tipo de mutação foi diferente, reforçando a sugestão de que o espectro mutacional do gene pode variar em função de características étnicas e/ou regiões geográficas <sup>4</sup> .

No Brasil, Chaves e cols.<sup>30</sup> analisando os exons 5-9 do gene em 76 pacientes com carcinoma da cavidade oral, detectaram mutação em 40,0% dos casos. Estes autores não observaram associação entre as mutações e os hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas no grupo de pacientes que foram estratificados de acordo com a intensidade do consumo e a localização do tumor.

Em nosso estudo a freqüência e os tipos de mutações detectadas não mostraram associações com nenhum dos fatores de risco investigados

É importante considerar que, mesmo com as limitações contidas neste estudo, como o reduzido número de pacientes investigados, os resultados reforçam as observações de que a mutação no gene é um evento freqüente no carcinoma de

cavidade oral e não está associada aos dados clinico-patológicos. Os resultados conflitantes quanto à influência dos fatores de risco sobre as alterações observadas no gene *TP53* sugerem a necessidade de estudos mais amplos, prospectivos com acompanhamentos dos pacientes e metodologias de investigação melhor padronizadas.

## VI.9 Referências Bibliográficas

1. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Oral e Maxilofacial, pp 798. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2ª Edição, 2004.4
2. ParKin DM, Whelan SL, Ferlovoy J, Raymond L, Young J. Cancer incidence in five continents, vol VII (IARC Scientific Publications nº 143). Lyon: IARC, 1997.
3. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa da Incidência e Mortalidade por câncer no Brasil, 2006. Disponível: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>. Acesso em: maio 2006.
4. Moura Gallo CV, Silva Mendonça GA, Moraes E, Olivier M, Hainaut P. *TP53* mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin América: Current knowledge and perspectives. *Mut Res* 2005; 589: 192-207
5. Pütz A, Hartmann AA, Fontes PRO, Alexandre COP, Silveira DA, Klug SJ, Rabes HM. *TP53* mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high-risk area (Southern Brazil): Role of life style factors. *Int J Cancer* 2002; 98:99-105.
6. Araujo Filho VJ, De Carlucci Junior D, Sasaki SU, Montag E, Azato FN, Cordeiro AC, Ferraz AR. Perfil de incidência do câncer oral em um hospital geral de São Paulo. *Rev Hosp Clin Fac Méd São Paulo* 1998;53(3)110-3.
7. Chen J, Katz RV, Krutchkoff DJ. Intraoral squamous cell carcinoma: epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. *Cancer* 1990; 66(6): 1288-96
8. Venturi BRM, Pamplona ACF, Cardoso AS. Carcinoma de células escamosas da cavidade oral em pacientes jovens e sua crescente incidência: revisão de literatura. *Ver Bras Otorrinolaring* 2001; 70(50): 679-686.



9. Goldenberg D. Maté:a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Onc* 2002; 38:646-649.
10. Carvalho AI, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in developing and a developed nation. *Head and Neck* 2004; 256:31-38.
11. Nogueira RLM, Lima GM, Rabenhorst SHB, Ferreira FVA. Detecção da p53 em lesões benignas e malignas da mucosa bucal: correlação com o hábito de fumar. *Rev. de Cirur. e Traumatologia buco-Maxilo-facial* 2004; 62(4): 53-62
12. Rowley H Helliwell TR, Jones AS, Roland NJ, Field EA, Field JK. An immunohistochemical analysis of p53 protein expression in pre-malignant and malignant tissue of the oral cavity. *Clin.Otolaryngol.* 1997; 22(1): 23-29.
13. Girord SC, Pfeiffer P, Ries J, Page HD. Proliferative activity and loss of function of tumor suppressor genes as “biomarkers” in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998; 36(4):252-260.
14. Barel R, Patnik S, Das BR. Co-overexpression of p53 and c-myc proteins linked with advanced stage of betel and tobacco related oral squamous cell carcinoma from eastern Indian. *Eur J Oral Sci* 1998; 106(5):907-913.
15. Ng IO, Lam KY,Ng M, Regezi JA. Expression of p21/waf1 in oral squamous cell carcinomas-correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. *Oral Oncol* 1999; 35(1):63-69.
16. Yao L, Iwai M, Furuta I. Correlation of bcl-2 and p53 expression with the clinicopathological features in tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999; 35(1)56-62.
17. Chiang CP, Huang JS, Wang JT, Liu BY, Kuo YS, Hahn L. Expression of p53 correlates with decreased survival in patients with quid chewing and smoking-

- associated oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1999; 28(2):72-76.
18. Field JK, Zoumpourlis V, Spandidos DA, Jones AS. *Cancer Detec Prev* 1994; 18(3):197-208.
  19. Matthews JB, Scully C, Jovanovic A, Van Der Waal I, Yeudall WA, Prime SS. Relationship of tobacco/alcohol use to p53 expression in patients with lingual squamous cell carcinomas. *Eur.J. Cancer B. Oral Oncol.* 1993; 29 B(4):285-289.
  20. Yan JJ, Tzeng CC, Jin YT. Overexpression of p53 protein in squamous cell carcinoma of buccal mucosa and tongue in Taiwan: an immunohistochemical and clinicopathological study. *Oral Pathol Med*, 1996; 2(25):55-59.
  21. Kerdpon D, Sriplung H, Kietthubthew S. Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma and its association with risks habits in southern Thailand. *Oral Oncol* 2001; 37:553-557.
  22. Li Y-Q, Pavelic ZP, Wang LJ et al. Altered p53 in microdissected, metachronous, premalignant and malignant oral lesions from the same patients. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1995;48:M269-M272.
  23. Werness BA, Levine AJ, Howley DM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 protein with p53. *Science* 1990; 248: 76-79.
  24. Kubbutat MH, Jones SN, Vouden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997; 387:299-303.
  25. Soussi T, & Bérout C. . Assessing *TP53* status in human tumor to evaluate clinical outocme. *Nature Cancer Reviews* 2001; 1:233-240.
  26. Editorial. p53 na prática clínica: sim ou não ? *Arq.Gastroent.* 1(43):1-5, 2006.
  27. Hall PA, McCluggage WG. Assessing p 53 in clinical contexts: unlearned lessons a new perspectives *J Pathol.* 2006; 208; 1-6

- 28.** Hsieh LL, Wang PF, Chen IH, Liao CT, Wang HM, Chen MC, Chang JT, Cheng AJ. Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese. *Carcinogenesis*, 2001; 9(22): 1497-1503.
- 29.** Yamazaki Y, Chiba I, Hirai A, Sugiura C, Notani K, Kashiwazaki H, Tei K, Totsuda Y, Fukuda H. Specific p53 mutation predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2003;39:163-169.
- 30.** Chaves ACM, Cherubini K, Herter N, Furian R, Santos DS, Squier C, Domann F. Characterization of p53 gene mutations in a Brazilian population with oral squamous cell carcinomas. *Int J Onc* 2004; 24:295-303.

## **VII ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS**

---

### **VII.1 Title**

Mutations in the *TP53* gene in oral squamous cell carcinoma: clinical-pathological characteristics and correlation with risk factors in the population of Rio Grande do Sul state.

### **VII.2 Authors**

Juliane Cristina Silva de Azevedo, Ana Paula Frazzon, Andrea Pires Souto Damin, Graziela Agnes, Mariana Cristina Silva de Azevedo, Antonio Atalíbio Hartmann, Claudio Osmar Pereira Alexandre.

### **VII.3 Abstract**

Oral cavity cancer is among the six most commonly found neoplasms in males in the state of Rio Grande do Sul (Brazil), being a significant public health issue. In order to identify the frequency and types of mutation in the *TP53* gene in oral squamous cell carcinoma and possible associations with patients' life style, 40 cases were analyzed using immunohistochemistry (IH). Then, 23 cases had the exons 5, 6, 7 and 8 of the *TP53* gene sequenced. The sample included both males and females, with a predominance of males (3.4:1), average age was  $55.7 \pm 15.1$  years. Concerning the total cases, 62.5% presented with a tumor located on the tongue being 55.0% in stage IV. The IH analysis detected an accumulation of p53 protein in

72.5% of the cases. Thirteen mutations were found in the 23 cases sequenced, with 6 transversions, 5 transitions and 2 insertions, out of which 8 were missense, 3 silent and 2 frameshift. Most of these mutations were found on exon 6 (46.2%) and on exon 8 (23.0%). 23.0% of the mutations were located in codons called hotspots. Although the mutation in the *TP53* gene is a frequent event in tumors of the oral cavity, no statistically significant correlations were found in relation to the investigated risk factors.

Key words: oral squamous cell carcinoma, *TP53*, mutation, IH, sequencing.

#### **VII.4 Introduction**

Epidermoid or squamous carcinoma accounts for approximately 90% of tumors found in the oral cavity <sup>1</sup>. The average annual incidence and mortality rates, however, vary considerably among different ethnic groups, gender, age groups and geographic region. Like in other carcinomas, there is an increased risk associated with age, with the higher incidence are found in the sixtieth decade of life. The disease affects more males than females <sup>2</sup>. In Brazil, incidence estimates for 2006 re 10.91/100000 males and 3.93/100000 females, with Rio Grande do Sul being the state with the largest number of cases in Sout-0.4.d Gr0.4.d Gu/Span ₹ -26.73 2 Tc 0.03226 Tf-

The distributions of mutations of the *TP53* gene can be used as information on the nature of the mutagenic mechanisms, providing a hint of the etiology and molecular pathogenesis of this disease <sup>4</sup>.

In the present study we assessed the frequency and distribution of mutations in the *TP53* gene in individuals with carcinoma of the oral cavity and the possible relationship with the risk factors alcohol consumption, smoking and mate tea drinking.

## **VII.5 Material and Methods**

An assessment was made of patients with confirmed OSCC (oral squamous cell carcinoma) diagnosis who underwent tumor resection surgery at the Head and Neck Surgery Service of the Santa Rita Hospital of the Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil) from June 2003 to June 2004. Patients answered a structured questionnaire in which factors such as age, gender, profession, rural or urban origin, smoking, consumption of alcohol and mate tea and the concurrent presence of malignant esophageal neoplasm were assessed. Clinical-pathological data were obtained from medical records.

### **Specimens**

Surgery specimens were fixed and embedded in paraffin in the Pathology Laboratory of the Hospital. Serial sections were taken from each paraffin block in the following order: a 3µm thickness section placed on a glass slide without any additives for standard HE staining; a 3µm section placed on a silane coated glass slide for the immunohistochemistry test (IH); and two 10µm sections placed on a glass slide without any additives for molecular biology tests.

### **Immunohistochemistry**

Paraffin was removed from the sections with xylol and rehydrated in different ethanol concentrations, was submitted to antigenic reactivation by a sodium citrate solution at pH 6.0 and incubated with the primary antibody anti-human p53 protein (clone DO-7, DAKO, Carpinteria, USA) in the concentration 1:20. Then, detection of the primary antibody was realized with the LSAB+ System Kit regarding the manufacturer instructions (DAKO, Carpinteria, USA).

Slides were analysed under a light microscope (Olympus Bx40) connected to a digital image analysis equipment (LEICA Q500MC).

Tumors with brownish staining in the nucleus were considered positive, using as positivity criteria for slides a minimum value of 5%, counting 10 fields of greater magnification (400x) a total of 1000 cells.

### **DNA Isolation**

The serial slide with a 10µm thickness section was laid over the HE slides where the tumor area had been previously delimited. The outlined material was scraped using a sterile knife blade and the material was placed in small polypropylene tubes with a lid. The DNA from 23 randomly selected tissue samples was extracted using the NucleoSpin® Kit (Macherey & Nagel, Solana Beach CA, USA), according to the manufacturer's instruction. Briefly, paraffin was removed by successively washing the samples with 1ml xylol and 1ml absolute alcohol. After the last washing, samples were kept at 37°C for approximately 15 minutes. For cell lysis, samples were incubated at 55°C in a buffered proteinase K solution and left there overnight. Then, samples were washed and passed through a silica membrane. DNA was eluted in 80µl elution buffer and stored at -20°C.

### **Automatic DNA Sequencing**

All 23 DNA samples were submitted to an amplification reaction by PCR (Polymerase Chain Reaction) with the use of specific primers for exons 5, 6, 7 and 8 of the *TP53* gene (Table 3 – Annex C).

The amplification of the *TP53* gene was done with the equipment Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Each amplification reaction was done in a total volume of 50µl and contained 20mM Tris-HCL (ph 8.4), 50mM of KCl, 1.5mM of MgCl<sub>2</sub>, 1.0 U of Taq DNA polymerase Platinum (Exon 6: 1.5 U), 0.2mM of each dNTP, 20pmol of each primer (exon 6: 40pmol) and 50-100ng of DNA extracted from each sample. PCR was done with a first step of denaturation at 94°C for 5 min and a final extension step at 72°C for 10min. The following steps were specific for each exon according to Pütz et al. <sup>5</sup>. The PCR product was analyzed by electrophoresis in an agar gel at 2% marked with ethidium bromide. Negative and positive controls were used in each amplification reaction.

The analysis of the sequence of fragments from exons 5, 6, 7, 8 was done using the BigDye® Terminator V3.1 cycle sequencing reaction kit (Applied BioSystems) in the automatic sequencer ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied BioSystems, Foster City, CA) following the manufacturer's instruction.

## **VII.6 Statistical Analysis**

By mean calculation, standard deviation, frequency and percentage, a data descriptive analysis was done in the form of graphs and tables. Then, the inferential analysis was conducted using Fisher's exact test, the Chi-squared test (followed by standardized adjusted residuals).

## **VII.7 Results**



The sample had both male and female subjects, average age  $55.7 \pm 15.1$  with a predominance of males (3.4:1), see Table 4 (Annex C). A significant percentage of patients reported smoking (70.0%), alcohol (67.5%) and mate tea consumption (85.0%). Most reported an exposure time longer than 20 years (85.7% for smoking, 74.1% for alcohol and 75.6% for mate tea). In 55% of the cases there was concomitant smoking, alcohol and mate tea consumption (Table 5 – Annex C).

Regarding the clinical-pathological data, most samples were classified as moderately differentiated carcinomas (42.5%), being located in 62.5% of cases on the tongue alone or in association with disease in the floor of the mouth (5%). Most patients had stage IV tumors (55.0%) it means an advanced disease.

Immunohistochemistry detected a nuclear accumulation of p53 protein in 72.5% of the cases studied (Figures 2 and 3 - Annex C).

Comparing p53 positivity findings with clinical-pathological data, no statistically significant differences were found and, likewise, no significant correlations were found with the selected risk factors (Table 6 – Annex C).

The Table 7 (Annex C) shows the mutation distribution observed in the *TP53* gene. Regarding the 23 sequenced tumors, 11 presented mutations. Two cases showed more than one mutation. Case 3 with a transversion and one transition and case 4 with two transversions.

In two samples we had observed that the nucleotide exchange, in the respective codon, had not result in change in the amino acid sequence of the protein.

The mutations showed an uneven distribution among exons. A larger number of mutations were found on exon 6 (46.2%).

The most frequently found mutation was missense (61.5%). The remaining mutations were: 3 silent mutations and 2 insertions (frameshift).

Regarding distribution in the exons, several codons have been affected. Three mutations were found on codon 213, two mutations on codon 273, one transversion and one insertion. The other codons 148, 164, 200, 210, 215, 237, 248 and 281 had one mutation each. Three mutations affected codons defined as hotspots (248 and 273).

The frequency and the types of the detected mutations had not allowed associations with none of the investigated risk factors.

## **VII.8 Discussion**

In the present study, an investigation was made of 40 OSCC cases coming from tumor resection surgeries performed at the Santa Rita Hospital (ISCOMPA), considered a reference center in our area. The greater incidence in males, in a 3.4:1 ratio and average age 55.7 years are in agreement with literature data <sup>6,7</sup>. On the other hand, it is interesting to notice that in our sample 6 patients (15.0%) were younger than 45 years. In the literature, OSCC cases in this age group are an uncommon finding, ranging from 0.24% to 9.0%<sup>8</sup>. We did not find a justification for the frequency of young individuals detected in our sample. We believe that this can represent only a diversion concerning the reduced numbers of patients investigated.

Regarding the epidemiological data, our series showed a significant number of smokers (70.0%), alcohol drinker (67.5%) and people who drink mate tea (85%), with the majority (more than 70%) reporting an exposure time longer than 20 years. Although smoking and/or alcohol consumption are considered risk factors that have already been well established for this type of tumor, the consumption of mate tea is still controversial <sup>3,9</sup>. It should be pointed out that among the 6 patients who were

younger than 45 years only 4 reported the habit of drinking mate tea, with an exposure time ranging from 7 to 19 years.

Even considering the small number of such patients, this remark is in agreement with reports by several authors, who suggest that other risk factors, beyond the alcohol and the tobacco are associates in the occurrence of OSCC in young people <sup>8,9</sup>.

Regarding the clinical-pathological data, most patients were in stage IV accounting 55.0% of all cases, i.e., with advanced disease. We should stress the fact that all cases in the sample had an indication for surgical resection. Studies report that cancer of the oral cavity in Brazil is treated at a later stage, with most patients who come to hospital presenting an advanced stage tumors <sup>3,10</sup>.

The p53 protein accumulation that reflects the alterations in the primary molecule structure in general has been detected in 72,5% of the cases. These results are in agreement with those of others authors, whose amplitude values varied from 40% to 78.9%. Confirming the high prevalence of mutations of this protein in OSCC <sup>11</sup>.

The role of the p53 protein, as an isolated prognostic factor, is still controversial. Some studies had not observed associations among the detention of the p53 protein, age, tumor location, stage, or histological differentiation <sup>11,12,13</sup>. On the other hand, there are some studies relating a significant association among accumulation of p53 and histological differentiation <sup>14,15</sup> and the linfonodal status <sup>16</sup>. Our results had not shown significant association for the mutation of the p53 protein between those detected by the IH technique and clinical-pathological data analyzed.

Inconsistent results were found looking for the association of the accumulation of the p53 protein and the risk factors, such as, smoking and alcohol drinking habits <sup>11, 17, 18, 19, 20,21</sup>.

Nogueira e cols. investigating 34 patients with OSCC in the northeast Brazil, they had observed a significant correlation between the expression of p53 and the smoking habit <sup>11</sup>. Chiang and cols.<sup>17</sup> and Yan and cols.<sup>20</sup> observed a greater number of individuals with positive reaction p53 between not-smokers and not adepts of betel use (leaf of the *Piper betle* vegetable consumed in southeastern India and parts of Asia) when compared with those who possess both habits. Field and cols.<sup>18</sup> had found correlation between the accumulation of p53 and the intense cigarette consumption, but not with the intense alcohol consumption.

Matthews and cols.<sup>19</sup>, analyzing 40 Dutch patients with OSCC with either as concomitant habit or as isolated habit of smoking or alcoholic drinking they had not observed association with the accumulation of p53. Kerdpon and cols <sup>21</sup>. had observed a tendency of an inverse association among the p53 accumulation and the exposure time of tobacco or betel and the positive association with the exposition time to alcoholic drinking in patients in Thailand <sup>23</sup>.

In our study, we did not observe any association between the p53 accumulation and each investigated risk factors.

The diverse results, referenced in different studies may have, in a part, the proper limitation of the IH technique. The detection of the nuclear accumulation of the protein p53, is based on the property of the protein, when mutated become steady in contrast of the native p53 who is unstable, not offering conditions of being detected by the target technique <sup>22</sup>. However the presence or the absence of detectable concentrations of p53 may cause other factors. The stabilization of the protein p53 may occur by the interaction with the E6 protein expressed by HPV16 or HPV18 <sup>23</sup>. The degradation route of p53 may be injured in function of the activity alteration of the MDM2 protein <sup>24</sup>. The presence of nonsense mutations may express a truncated protein and not detectable by the immunologic method <sup>25,26</sup>.

The sequencing of exons 5-8 of the *TP53* gene in 23 samples showed mutations in 11 cases. Being that, in 2 of them, the detected mutation was silent type, that is, did not produce alteration in the amino acid sequence of the protein. In reason of that we must consider that in only 9 cases (39.1%) it had altered the primary structure of the protein. Observing, in this way, a strong discrepancy between the values gotten by the technique of IH (72.5%) and by the direct DNA sequencing (39.1%).

As already mentioned, the IH technique presents some limitations that can conduct to significant deviations<sup>26</sup>. On the other hand, Soussi & Bérourd<sup>25</sup> had shown that, in more than 1,200 publications, only 14% of them had analyzed the entire segment of the gene *TP53*, (except exon 1) and had indicated that the focus in exons 5-8 can conduct to false conclusions, in account of that 13.6% mutations had been located outside of the cited exons. A significant number of mutations were detected in exons 4, 10 and other in lesser number in exon 9.

The mutational spectrum was ample and the detected analysis was as we waited. Alterations in codons that are frequently mutated, for example the codons 248 and 273 together with codon 175 are responsible for 19% of all the mutations described in the *TP53* Database (<http://www-p53.iarc.fr/>). It should be pointed that, in our study, these two mutations: 248 (missense) and 273 (frameshift) had been detected in two patients with ages of 28 and 25 years that had not report alcohol drinking or tobacco use. The first mutation, revealed a typical event in the site hotspot CpG, suggesting the influence of endogenous factors derived from the proper cellular metabolism (spontaneous mutation). In this in case the cytosine base in the position 5' tends to be modified transforming itself into 5-metilcitosina and then it can suffer a spontaneous loss of the amino radical (NH<sub>2</sub>) and become a timine base, causing a transition C>T<sup>27</sup>. Yet in the second mutation, an insertion, even located in a hotspot

site, it was detected in only 2% of the OSCC cases not describing any association to this event (IARC *TP53* Mutation Database).

Hsieh et al.<sup>27</sup> investigating 187 patients with OSCC in Taiwan, using the SSCP technique and direct DNA sequencing of the exons 5-9 in *TP53* gene they detected 48,66% of mutation. The mutation incidence did not demonstrate any association with clinical-pathological parameters nor with the smoking or betel chewing habits. However, among the alcohol consumer's significant incidences of mutations were detected when compared with those who did not relate the habit of ingesting alcohol. The mutational spectrum disclosed a predominance of transitions G:C>A:T associated with tobacco use and betel consumption, however it must be considered that 62.5% of these mutations were situated hotspot CpG sites<sup>6</sup>.

Yamazaki and cols<sup>28</sup>. analyzing exons 5-8 of the *TP53* gene in biopsy or fresh surgical resection material of 121 patients of Hokkaido (Japan) by the SSCP technique and direct DNA sequencing, had not observed significant correlation with the clinical-pathological parameters. It was detected mutation in 42% in that cases with a predominance of transitions G:C>A:T, the majority of located them in the hotspot CpG sites.

It is interesting to point out that our study detected 38.4% of the mutations in same codons (148, 213, 237, 248, 273) identified in these two studies, however the type of mutation was different, reinforcing the suggestion that the mutational spectrum of *TP53* gene can vary in function of ethnic characteristics and geographic regions<sup>4</sup>.

In Brazil, Chaves et al.<sup>30</sup> analyzing exons 5-9 of gene *TP53* in 76 patients with OSCC, they detected mutation in 40.0%. These authors had not observed association between alcohol ingestion and smoking habits in stratified groups in accordance with the consumption and localization of tumor.

In our study the frequency and the types of detected mutations had not allowed associations with none of the investigated risk factors.

It is important to consider that, even with the limitations contained in this study, like the reduced number of investigated patients, the results are reinforced that the mutation in *TP53* gene is a frequently an event in the OSCC and is not associated with the clinical-pathological data.

The conflicting results as much the influence of the risk factors on the alterations observed in *TP53* gene subjects the necessity of wide and prospective studies, with longest accompaniment and better inquiry standardized methodologies.

## **VII.9 References**

1. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Oral e Maxilofacial, pp 798. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2<sup>a</sup> Edição, 2004.

2. ParKin DM, Whelan SL, Ferlovoy J, Raymond L, Young J. Cancer incidence in five continents, vol VII (IARC Scientific Publications n° 143). Lyon: IARC, 1997.
3. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Brasil. Ministério da Saúde. Estimativa da Incidência e Mortalidade por câncer no Brasil, 2006. Disponível: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>. Acesso em: maio 2006.
4. Moura Gallo CV, Silva Mendonça GA, Moraes E, Olivier M, Hainaut P. *TP53* mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin América: Current knowledge and perspectives. *Mut Res* 2005; 589: 192-207.
5. Pütz A, Hartmann AA, Fontes PRO, Alexandre COP, Silveira DA, Klug SJ, Rabes HM. *TP53* mutation pattern of esophageal squamous cell carcinomas in a high-risk area (Southern Brazil): Role of life style factors. *Int J Cancer* 2002; 98:99-105.
6. Araujo Filho VJ, De Carlucci Junior D, Sasaki SU, Montag E, Azato FN, Cordeiro AC, Ferraz AR. Perfil de incidência do câncer oral em um hospital geral de São Paulo. *Rev Hosp Clin Fac Méd São Paulo* 1998;53(3)110-3.
7. Chen J, Katz RV, Krutchkoff DJ. Intraoral squamous cell carcinoma: epidemiologic patterns in Connecticut from 1935 to 1985. *Cancer* 1990; 66(6): 1288-96
8. Venturi BRM, Pamplona ACF, Cardoso AS. Carcinoma de células escamosas da cavidade oral em pacientes jovens e sua crescente incidência: revisão de literatura. *Ver Bras Otorrinolaring* 2001; 70(50): 679-686.
9. Goldenberg D. Maté: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. *Oral Onc* 2002; 38:646-649.



10. Carvalho AI, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in developing and a developed nation. *Head and Neck* 2004; 256:31-38.
11. Nogueira RLM, Lima GM, Rabenhorst SHB, Ferreira FVA. Detecção da p53 em lesões benignas e malignas da mucosa bucal: correlação com o hábito de fumar. *Rev. de Cirur. e Traumatologia buco-Maxilo-facial* 2004; 62(4): 53-62
12. Rowley H Helliwell TR, Jones AS, Roland NJ, Field EA, Field JK. An immunohistochemical analysis of p53 protein expression in pre-malignant and malignant tissue of the oral cavity. *Clin.Otolaryngol.* 1997; 22(1): 23-29.
13. Girord SC, Pfeiffer P, Ries J, Page HD. Proliferative activity and loss of function of tumor suppressor genes as “biomarkers” in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998; 36(4):252-260.
14. Barel R, Patnik S, Das BR. Co-overexpression of p53 and c-myc proteins linked with advanced stage of betel and tobacco related oral squamous cell carcinoma from eastern Indian. *Eur J Oral Sci* 1998; 106(5):907-913.
15. Ng IO, Lam KY,Ng M, Regezi JA. Expression of p21/waf1 in oral squamous cell carcinomas-correlation with p53 and mdm2 and cellular proliferation index. *Oral Oncol* 1999; 35(1):63-69.
16. Yao L, Iwai M, Furuta I. Correlation of bcl-2 and p53 expression with the clinicopathological features in tongue squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999; 35(1)56-62.
17. Chiang CP, Huang JS, Wang JT, Liu BY, Kuo YS, Hahn L. Expression of p53 correlates with decreased survival in patients with quid chewing and smoking-associated oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1999; 28(2):72-76.

18. Field JK, Zoumpourlis V, Spandidos DA, Jones AS. Cancer Detec Prev 1994; 18(3):197-208.
19. Matthews JB, Scully C, Jovanovic A, Van Der Waal I, Yeudall WA, Prime SS. Relationship of tobacco/alcohol use to p53 expression in patients with lingual squamous cell carcinomas. Eur.J. Cancer B. Oral Oncol. 1993; 29 B(4):285-289.
20. Yan JJ, Tzeng CC, Jin YT. Overexpression of p53 protein in squamous cell carcinoma of buccal mucosa and tongue in Taiwan: an immunohistochemical and clinicopathological study. Oral Pathol Med, 1996; 2(25):55-59.
21. Kerdpon D, Sriplung H, Kietthubthew S. Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma and its association with risks habits in southern Thailand. Oral Oncol 2001; 37:553-557.
22. Li Y-Q, Pavelic ZP, Wang LJ et al. Altered p53 in microdissected, metachronous, premalignant and malignant oral lesions from the same patients. J Clin Pathol: Mol Pathol 1995;48:M269-M272.
23. Werness BA, Levine AJ, Howley DM. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 protein with p53. Science 1990; 248: 76-79.
24. Kubbutat MH, Jones SN, Vouden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. Nature 1997; 387:299-303.
25. Soussi T, & Bérout C. . Assessing *TP53* status in human tumor to evaluate clinical outcome. Nature Cancer Reviews 2001; 1:233-240.
26. Editorial. p53 na prática clínica: sim ou não ? Arq.Gastroent. 1(43):1-5, 2006.
27. Hall PA, McCluggage WG. Assessing p 53 in clinical contexts: unlearned lessons a new perspectives J Pathol. 2006; 208; 1-6
28. Hsieh LL, Wang PF, Chen IH, Liao CT, Wang HM, Chen MC, Chang JT, Cheng AJ. Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell

carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese. *Carcinogenesis*, 2001; 9(22): 1497-1503.

- 29.** Yamazaki Y, Chiba I, Hirai A, Sugiura C, Notani K, Kashiwazaki H, Tei K, Totsuda Y, Fukuda H. Specific p53 mutation predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2003;39:163-169.
- 30.** Chaves ACM, Cherubini K, Herter N, Furian R, Santos DS, Squier C, Domann F. Characterization of p53 gene mutations in a Brazilian population with oral squamous cell carcinomas. *Int J Onc* 2004; 24:295-303.

## **ANEXO A – REAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA**

---

### **Técnica de imunohistoquímica**

(Adotada pelo Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Patologia da FFFCMPA)

1. Colocar o corte do tecido (cortes com 3µm) a ser testado na lâmina preparada com organossilano;
2. desparafinar o material na estufa a 60°C por 30 minutos;
3. fazer a imersão das lâminas em xilol (uma vez por 5 minutos), álcool absoluto (passagem por 3 cubas), álcool absoluto (uma vez por 5 minutos) e água destilada;
4. recuperação antigênica:
  - colocar as lâminas dentro de uma panela de pressão em solução de citrato de sódio\* (pH 6,0) e deixar ferver por 4 minutos;
  - retirar o material da panela de pressão e deixar esfriar a temperatura ambiente por 20 minutos;
  - lavar as lâminas em água destilada por 5 minutos.
5. lavar as lâminas com solução tampão fosfato (PBS\*\*) 2 vezes durante 5 minutos;
6. bloqueio da peroxidase endógena:
  - fazer a imersão das lâminas em água oxigenada 10 volumes, 2 vezes por 10 minutos;
7. lavar em água corrente e em água destilada por 5 minutos;
8. lavar com solução tampão fosfato (PBS) 2 vezes por 5 minutos;

9. escorrer o excesso de tampão e secar as bordas dos cortes histológicos;
10. demarcar os cortes com caneta DAKOPEN (S2002, DAKO);
11. aplicar o anticorpo primário anti-p53 diluído em solução de albumina bovina\*\*\* e incubar em câmara úmida tampada durante 1 hora;
12. lavar com solução tampão fosfato (PBS) 2 vezes por 5 minutos;
13. escorrer o excesso de tampão e secar a bordas dos cortes histológicos;
14. aplicar o anticorpo secundário biotilado ( kit LSAB+Detection System), incubar em câmara úmida por 30 minutos;
15. lavar com solução tampão fosfato (PBS) 2 vezes por 5 minutos;
16. escorrer o excesso de tampão e secar a bordas dos cortes histológicos;
17. aplicar o complexo strepto-avidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB+Detection System), incubar em câmara úmida durante 30 minutos;
18. lavar com solução tampão fosfato (PBS) 2 vezes por 5 minutos;
19. escorrer o excesso de tampão e secar a bordas dos cortes histológicos;
20. aplicar o cromógeno DAB\*\*\*\*, deixando-o atuar por no mínimo 5 min.;
21. lavar em água destilada por 5 minutos;
22. mergulhar em hematoxilina de Harris pura durante 30 segundos para contra-corar;
23. passar as lâminas em álcool absoluto (4 vezes por 5 minutos) e em xilol (2 vezes por 5 minutos);
24. montar as lâminas com lamínula e cola especial *Entellan* (1079610100, Merck).

\* Solução de citrato de sódio 0,01M: diluir 2,58g de citrato de sódio em 1 litro de água destilada. Medir o pH e ajustá-lo em pH 6,0 com HCl 1N ou NaOH.

\*\* Solução tampão fosfato – PBS (Phosphate Buffered Saline), 0,01M: misturar 800 ml de água destilada + 26,5 ml da solução A + 173,5 ml da solução B + 8 g da NaCl. Medir o pH e ajustá-lo entre 7,2 e 7,8 com HCl ou NaOH.

Solução A: diluir 13,8 g de sódio fosfato monobásico monohidratado em 1 litro de água destilada.

Solução B: diluir 17,8 g de sódio fosfato bifásico anidro em 1 litro de água destilada.

\*\*\* Solução de albumina bovina (fração V, 11018-017, GibcoBRL, Life technologies): diluir 5 g do pó em 100 ml de água destilada. Aliquotar em frascos com 1,25 ml e congelar.

Solução de uso para diluição do anticorpo primário: diluir uma alíquota (1,25 ml) em 49 ml de PBS.

\*\*\*\*DAB: diluir 60 mg do pó em 100 ml de PBS. Na hora do uso, acrescentar 200 a 250 µl de água oxigenada 10 volumes.

## **ANEXO B – ANÁLISE MOLECULAR**

---

### **Extração de DNA**

O DNA foi extraído das amostras de tecido com a utilização do Kit da NucleoSpin® (Macherey & Nagel, Solana Beach CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

### **Amplificação dos exons 5, 6, 7 e 8 por PCR**

A amplificação do gene *TP53* foi realizada através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) com o equipamento Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer). Cada reação de amplificação foi realizada em um volume total de 50µl e continha 20mM Tris-HCL (pH 8,4), 50mM de KCl, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1,0 U de Taq DNA polimerase Platinum (Exon 6: 1,5 U), 0,2mM de cada dNTP, 20pmol de cada primer (exon 6: 40pmol) e de 50-100ng de DNA extraído de cada amostra. A PCR foi realizada com uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min. e uma etapa de extensão final a 72°C por 10min. As etapas seguintes foram específicas para cada exon de acordo com Pütz e Cols (2002). O produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 2% marcado com brometo de etídio.

### **Seqüenciamento do DNA**

Os produtos da extensão foram analisados no aparelho ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foste City, CA). A análise da seqüência dos fragmentos de PCR foi realizada utilizando o *BigDye®*

*Terminator V3.1 cycle sequencing reaction kit* (Applied Biosystems) de acordo com as especificações do fabricante. Os *primers* senso de amplificação de PCR serviram como primers de seqüenciamento. As mutações detectadas foram confirmadas num segundo seqüenciamento usando *primers* anti-senso.



## ANEXO C – TABELAS E FIGURAS

**Tabela 3.** Seqüência dos primers

Primer	Seqüência (5'- 3')	Tamanho (pb)
Exon 5	CCGTGTTCCAGTTGCTTTAT CAACCAGCCCTGTCGTCTCT	290
Exon 6	TGGTTGCCAGGGTCCCCAG AGGGCCACTGACAACCA	224
Exon 7	AGGTCTCCCCAAGGCGCACT GGGGTCAGCGGCAAGCAGAG	230
Exon 8	GCTTGCTTACCTCGCTTAGT TGATTCCTTACTGCCTCTT	192

**Tabela 4 .** Distribuição dos casos em relação ao gênero e à faixa etária

Gênero	n	%	Idade $\pm$ DP	Amplitude
Masculino	31	77,5	56,12 $\pm$ 12,01	25 - 85
Feminino	09	22,5	53,85 $\pm$ 25,56	20 - 89
TOTAL	40	100	55,77 $\pm$ 15,11	20 - 89

**Tabela 5.** Distribuição dos casos de acordo com o uso de fumo, álcool, mate e a média do tempo de exposição em anos.

Hábito	Usuários (%)	Tempo de exposição
Fumo	28 (70,0)	36,82 $\pm$ 15,4
Álcool	27 (67,5)	32,59 $\pm$ 15,12
Chimarrão	34 (85,0)	33,76 $\pm$ 17,98

**Tabela 6.** Distribuição da positividade para p53 de acordo com o fator de risco

Fator de risco	IH	p53+	p53-	P*
	<b>FUMO</b>			
SIM		19	9	0,275
NÃO		10	2	
<b>ÁLCOOL</b>				
SIM		17	10	0,053
NÃO		12	1	
<b>MATE</b>				
SIM		25	9	0,536
NÃO		6	2	

\*valor de "p" (Teste exato de Fischer)

**Tabela 7.** Tabela demonstrativa dos tipos de mutações detectadas no gene *TP53* em amostras de carcinomas de cavidade oral de acordo com idade, gênero, IH, diferenciação tumoral e fatores de risco.

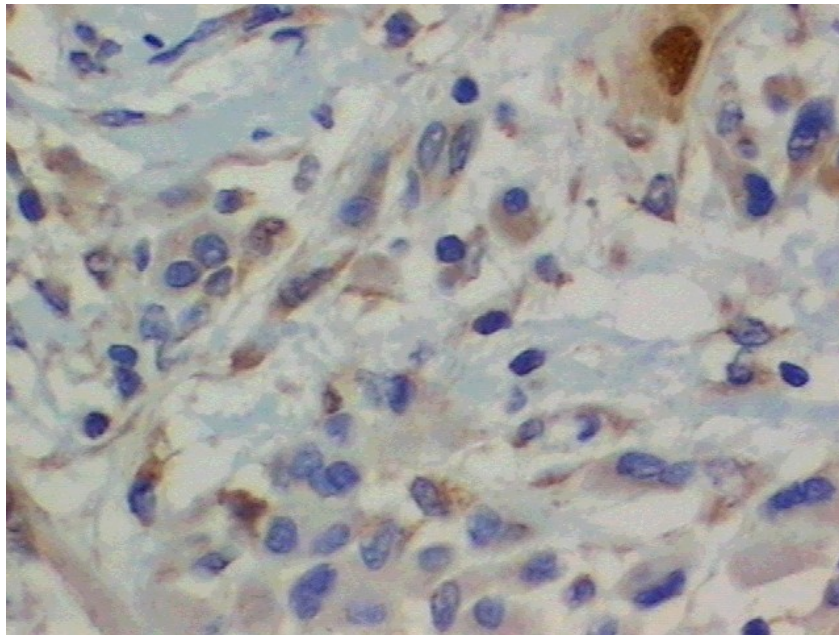
Nº caso	idade	gênero	IH	Histol. <sup>1</sup>	A <sup>2</sup>	F <sup>3</sup>	C <sup>4</sup>	Exon/ Códon <sup>5</sup>	Nucleotídeo trocado	Aminoácid o trocado	CpG <sup>6</sup>
3	79	M	+	M	+	+	+	5/148	<u>G</u> AT> <u>G</u> CT	Asp/Ala	-
								7/237	AT <u>G</u> >ATA	Met/Ile	-
4	63	M	-	M	+	-	+	6/213	CG <u>A</u> >CGC	Arg/Arg	+
								8/273hs	<u>C</u> GT> <u>G</u> GT	Arg/Gly	+
7	53	M	+	M	+	+	+	5/164	<u>A</u> AG> <u>G</u> AG	Lys/Glu	-
10	54	M	-	P	+	+	+	6/210	A <u>A</u> C>A <u>C</u> C	Asn/Thr	-
13	28	F	+	B	-	-	+	7/248hs	<u>C</u> GG> <u>I</u> GG	Arg/Trp	+
22	48	M	+	M	-	-	+	6/200	AAT>A <u>A</u> GT	<i>frameshift</i>	-
23	51	F	+	M	-	-	-	6/215	AG <u>T</u> >A <u>C</u> T	Ser/Thr	-
25	65	M	+	B	+	+	+	8/281	G <u>A</u> C>G <u>T</u> C	Asp/Val	-
30	89	F	+	B	-	-	-	6/213	CG <u>A</u> >CGG	Arg/Arg	-
31	80	F	+	B	-	+	+	6/213	CG <u>A</u> >CGG	Arg/Arg	-
34	25	M	+	B	-	-	+	8/273hs	ACG> <u>A</u> ACG	<i>frameshift</i>	+

1. Diferenciação tumoral: B, bem diferenciado; M, moderadamente diferenciado, P pouco diferenciado. 2. (+) Consome álcool, (-) não consome álcool. 3. (+) Fuma, (-) não fuma. 4. (+) Consome mate, (-) não consome mate. 5. Códon nativo à esquerda e códon mutante à direita (nucleotídeo trocado sublinhado) 6. Mutação em dinucleotídeo CpG (+) sim, (-) não. 7. hs mutação em códon hotspot.

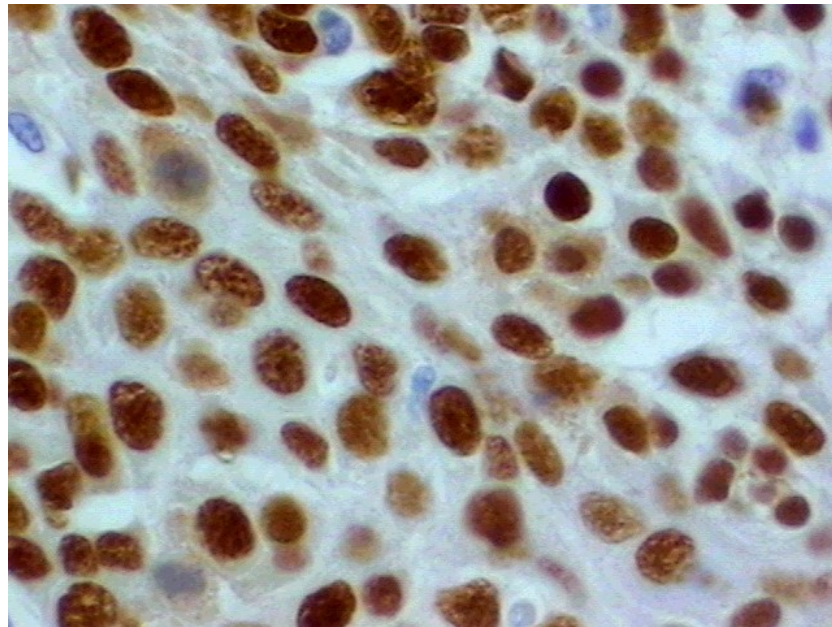
**Tabela 8.** Tabela com o sumário das 13 mutações observadas no gene *TP53* nas amostras de 23 pacientes com carcinoma de cavidade oral

Distribuição por exon	n	%
Exon 5	2	15,4
Exon 6	6	46,2
Exon 7	2	15,4
Exon 8	3	23,0
Mutações no sítio CpG	4	30,8
Transversões	5	46,1
Transições	5	38,5
Inserções	2	15,4

+

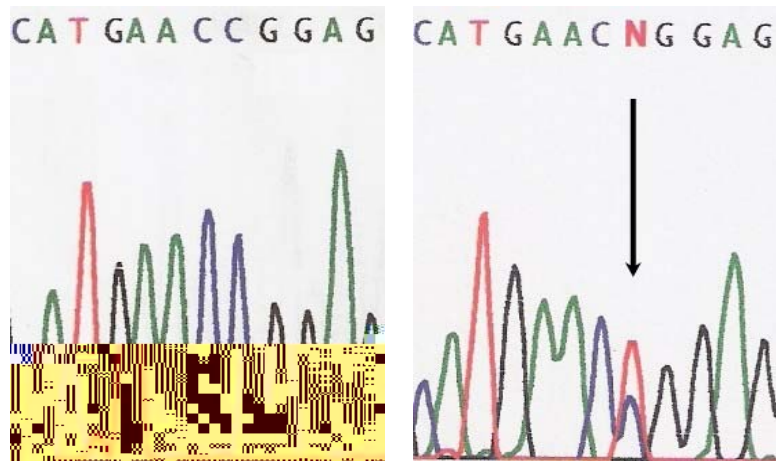


A.



B.

**Figura 2.** Fotomicrografia de reação imunohistoquímica anti-p53 positiva em 5% (A) e em 90% (B) das células de carcinoma de cavidade oral (400X).



**Figura 3.**Parte de um eletroferograma gerado pelo seqüenciador automático de DNA mostrando uma transição C>T no exon 7, códon 248, em um caso de carcinoma de cavidade oral (caso 13 da Tabela 7).

## **ANEXO D – TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

---

Prezado (a) paciente:

O Rio Grande do Sul é um dos estados que mais apresentam pessoas com câncer de boca.

Estamos realizando um estudo de casos de tumores semelhantes ao que o (a) Sr (a), apresenta na boca (carcinomas epidermóides de cavidade oral) que serão retirados por cirurgia.

Após a retirada do seu tumor pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita, o material será examinado no Laboratório de Patologia da Santa Casa para emissão do diagnóstico definitivo.

Nosso objetivo é de, após a emissão do diagnóstico definitivo, utilizar única e exclusivamente o material que ficará arquivado no Laboratório de Patologia para estudar melhor o tumor do (a) Sr (a). Queremos saber se há alguma relação entre determinadas características do tumor e os hábitos que o (a) Sr (a), possa apresentar ou não, como fumar, ingerir bebidas alcoólicas e beber chimarrão.

Do material incluído nos blocos de parafina serão realizados: (a) estudo da expressão da proteína p53 no tumor através do método de imunohistoquímica; (b) amplificação do gene *TP53*, através da reação em cadeia da polimerase (PCR); (c) seqüenciamento automático do respectivo DNA.

O material e os dados do questionário serão utilizados exclusivamente em pesquisa no Laboratório do Programa de Pós-Graduação em Patologia da

Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (FFFCMPA - ISCMPA).

Este estudo não pretende interferir na conduta terapêutica adotada pelo Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita em nenhuma etapa do tratamento.

Solicitamos a colaboração do (a) Sr (a), para que apenas responda um pequeno questionário e nos autorize a utilizar o material do seu tumor que ficará arquivado no Laboratório de Patologia em nosso projeto de pesquisa.

Tanto as respostas do questionário, quanto os resultados obtidos serão confidenciais e o (a) Sr (a), não será identificado em nenhuma hipótese.

O (a) Sr (a), tem o direito de não participar deste estudo sem que isto represente qualquer tipo de prejuízo para o seu atendimento dentro da instituição onde o projeto está sendo realizado.

O (a) paciente abaixo-assinado (a) foi informado sobre o projeto de pesquisa e concorda em participar do mesmo.

Porto Alegre, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_.

Nome

\_\_\_\_\_.

Assinatura do (a) paciente

**ANEXO E – QUESTIONÁRIO REFERENTE AO USO DE FUMO, ÁLCOOL E CHIMARRÃO**

---

NOME:

Idade:

PROFISSÃO que exerceu a maior parte do tempo? \_\_\_\_\_

Durante quantos anos? \_\_\_\_\_

FUMO ( ) Sim ( ) Não

Idade de início: \_\_\_\_\_ Não fuma mais desde: \_\_\_\_\_

ÁLCOOL ( ) Sim ( ) Não

Idade de início: \_\_\_\_\_ anos. Não bebe mais desde: \_\_\_\_\_.

CHIMARRÃO ( ) Sim ( ) Não

Idade de início: \_\_\_\_\_ anos. Não bebe mais desde: \_\_\_\_\_.

PRESENÇA DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESÔFAGO

( ) Não ( ) Concomitante ( ) Prévia há \_\_\_\_\_ anos.



# 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](#)