

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA**

**LUCINEI ROBERTO DE OLIVEIRA**

**IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO**  
**IMUNOHISTOQUÍMICA DO *p53* E *p63* E O PAPEL DO HPV NO**  
**CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

Ribeirão Preto

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**LUCINEI ROBERTO DE OLIVEIRA**

**IMPACTO PROGNÓSTICO DA EXPRESSÃO  
IMUNOHISTOQUÍMICA DO *p53* E *p63* E O PAPEL DO HPV NO  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**

Tese apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Patologia Experimental  
Orientador: Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE  
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA  
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Oliveira, Lucinei Roberto

Impacto prognóstico da expressão imunohistoquímica do *p53* e *p63* e o papel do HPV no carcinoma epidermóide oral. Ribeirão Preto, 2008.

165 p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Patologia  
Experimental.

Orientador: Ribeiro-Silva, Alfredo.

1. Câncer oral. 2. Carcinoma epidermóide oral. 3. Prognóstico.  
4. Sobrevida. 5. p53. 6. p63. 7. HPV.

Lucinei Roberto de Oliveira

Título: Impacto prognóstico da expressão imunohistoquímica do *p53* e *p63* e o papel do HPV no carcinoma epidermóide oral

Tese apresentada ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Patologia Experimental

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Dedico esta Tese aos meus pais,

***Luciano Rosa de Oliveira e Ana Maria de Oliveira***

## AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo e orientador, **Prof.Dr. Alfredo Ribeiro-Silva**, pela agradável convivência, pelas sugestões e pela oportunidade de contínuo aprendizado e desenvolvimento científico ao seu lado.

Ao meu amigo e co-orientador, **Prof.Dr. Sergio Zucoloto**, pelos ensinamentos, estímulos, oportunidade, generosidade, confiança e constante disponibilidade em ajudar. Um ser humano excepcional e uma pessoa rara de se encontrar.

Aos membros titulares da Comissão Julgadora, **Profa.Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani**, **Prof.Dr. Luiz Guilherme Brentegani**, **Profa.Dra. Suzie Aparecida de Lacerda** e **Prof.Dr. Sergio Zucoloto**, pela atenção, simpatia e disponibilidade em avaliar este trabalho, conferindo e valorizando o mérito científico de todo o nosso esforço.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu diretor, **Prof.Dr. Marcos Felipe Silva de Sá**.

Ao Presidente da Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Prof.Dr. Julio Sérgio Marchini**.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental do Departamento de Patologia da FMRP/USP, **Prof.Dr. Sérgio Britto Garcia**, pela oportunidade, colaboração e confiança.

Aos funcionários do Departamento de Patologia da FMRP – USP, especialmente as secretárias **Neide**, **Rosângela**, **Renata**, **Camila** e **Edna Pio** (*in memorian*), além da amizade, pela constante e simpática presença, auxiliando na resolução das partes burocráticas da Pós-Graduação.

Às funcionárias, **Deisy Mara da Silva**, **Márcia Aparecida Ferreira Oliva** e **Laura Midori Kawasse**, pela amizade e ótima convivência, assim como também pela imprescindível e excelente assistência técnica para a execução do presente trabalho.

À **CAPES**, **FAEPA**, **FAPESP** e **Pró-Reitoria de Pós-Graduação da USP**, pelo apoio financeiro concedido.

Aos **colegas da Pós-Graduação**, pela amizade e pelas experiências compartilhadas.

Ao **Prof.Dr. Aguinaldo Luiz Simões**, pela oportunidade de utilização e aprendizado em seu laboratório (Laboratório de Genética Bioquímica do Depto. de Genética da FMRP), além da disponibilidade e do auxílio para a melhoria da redação do trabalho publicado.

Às amigas e técnicas do Laboratório de Genética Bioquímica do Depto. de Genética da FMRP, **Ana Lúcia, Maria do Carmo, Cláudia, Juliana e Elisabete**, pelos ensinamentos, pela ajuda e paciência durante uma importante fase do estudo.

Aos funcionários responsáveis pelo arquivo do Depto. de Patologia no HC da FMRP, **Décio Barrionovo e César Augusto Junior**; além da amizade, por fazerem agradáveis e divertidos os momentos de trabalho por lá.

Ao **Prof.Dr. Miguel Angel Sala Di Matteo**, pela ajuda na análise estatística do trabalho.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico (**SAME**) do HC da FMRP, pelo valioso auxílio prestado durante a investigação dos prontuários médicos dos pacientes.

À minha namorada, **Andrielle de Castilho Fernandes**, pelo apoio, carinho, estímulo, ajuda, conselhos, compreensão, paciência e por tudo aquilo mais que eventualmente eu tenha esquecido de mencionar aqui.

Agradeço, enfim, a toda minha **família**, pelo apoio incondicional e permanente.



## **A ESTALAGEM DA RAZÃO**

*A meio caminho entre a fé e a crítica está a estalagem da razão. A razão é a fé no que se pode compreender sem fé; mas é uma fé ainda, porque compreender envolve pressupor que há qualquer coisa compreensível.*

– Trecho 176

Fernando Pessoa – Livro do Desassossego

Este trabalho contou com os seguintes apoios financeiros:

- **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP –**  
Processo n° 03/02532-8).
  
- **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**  
(Processo n° 476714/2004-4).
  
- **Coordenação de Aperfeiçoamento do Ensino Superior (CAPES).**
  
- **Fundação de Assistência ao Ensino e Pesquisa (FAEPA)** do Hospital das  
Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo.
  
- **Pró-Reitoria de Pós-Graduação** da Universidade de São Paulo.

Este trabalho resultou nas seguintes publicações:

1- Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Perfil da incidência e da sobrevivência de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **J Bras Patol Med Lab.** 42(5): 385-92, 2006.

2- Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Prognostic impact of p53 and p63 immunoeexpression in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.** 36(4): 191-7, 2007.

3- Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Prognostic significance of p53 and p63 immunolocalisation in primary and matched lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Acta Histochem.** 109(5): 388-96, 2007.

4- Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Ramalho LNZ, Simões AL, Zucoloto S. HPV infection in Brazilian oral squamous cell carcinoma patients and its correlation with clinicopathological outcomes. **Mol Med Rep.** 1: 123-9, 2008.

## RESUMO

OLIVEIRA, L. R. Impacto prognóstico da expressão imunohistoquímica do *p53* e *p63* e o papel do HPV no carcinoma epidermóide oral. 2008. 165f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil.

O Brasil está entre os países com os maiores índices de carcinoma epidermóide oral (CEO). O gene *p63* é um análogo do supressor tumoral *p53* e a influência da expressão de ambos no prognóstico do CEO ainda necessita ser melhor investigada. O envolvimento do papilomavírus humano (HPV) no CEO é outro fator ainda não elucidado. Nosso estudo objetivou avaliar os pacientes com CEO no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, assim como também investigar a relação entre a presença do HPV e a imunexpressão das proteínas *p53* e *p63* com alguns parâmetros relevantes ao prognóstico deste tumor. Os seguintes dados foram obtidos dos prontuários médicos de 424 pacientes: idade, gênero, localização e tamanho da lesão primária, história pregressa, consumo de tabaco e álcool, exposição actínica, traumatismo por prótese, recidivas, metástases, diferenciação tumoral, tratamento, sobrevida e óbitos. Cento e vinte e seis pacientes foram selecionados para o estudo da sobrevida, 106 para o estudo imunohistoquímico, 45 para a investigação IHQ com amostras pareadas (AP) e 87 para a reação em cadeia da polimerase para detecção do HPV e análise multivariada. Os tumores tiveram predominância em pacientes masculinos na 6ª década de vida, havendo após esta faixa etária um aumento dos casos no gênero feminino e menor sobrevida. A língua foi a região mais acometida, e as lesões em lábio inferior demonstraram maior atraso na procura pelo tratamento e relatos de exposição actínica desprotegida. As recidivas ocorreram em 30% dos pacientes, 28,8% tiveram metástases e 13,2% foram a óbito. Os tumores bem diferenciados foram predominantes (47,7%), e a sobrevida livre da doença (SLD) e a sobrevida global (SG) em cinco anos foram 19% e 24,3%, respectivamente. A imunexpressão de *p63* (87,8%) nos tumores foi maior que a de *p53* (52,8%), mas os tumores *p53* positivos estiveram significativamente associados aos casos de metástases. Os tumores *p53* negativos e com forte intensidade de imunexpressão de *p63* demonstraram melhor SG. No estudo com AP, os tumores com elevada imunexpressão de *p63* demonstraram melhor sobrevida e as neoplasias *p53* negativas tiveram melhor SLD. A maioria dos casos demonstrou um padrão concordante de imunexpressão nas AP (73,3% para *p53* e 53,3% para *p63*, respectivamente). O HPV foi encontrado em 18 (10,4%) amostras de CEO, correspondendo a 17 (19,5%) pacientes. Foram encontradas amostras positivas em 10 (11,5%) tumores primários e em 8 (9,2%) AP. Foram identificados os subtipos de HPV 16 e 18 em 4 (22,2%) e 3 (16,7%) das amostras positivas, respectivamente. Em 6 (33,3%) amostras foi encontrada a presença de ambos os subtipos e em 5 (27,8%) amostras não foi identificado. As amostras HPV positivas foram significativamente associadas aos pacientes não fumantes. Diferenças significativas relacionadas ao prognóstico do CEO na análise multivariada foram encontradas para idade, localização tumoral e *p53*. A imunexpressão de *p53* e a baixa intensidade da imunexpressão de *p63* demonstraram relação com pior prognóstico. Uma associação do HPV à carcinogênese oral foi observada nos pacientes não fumantes.

Palavras-chave: câncer oral, carcinoma epidermóide oral, prognóstico, sobrevida, *p53*, *p63*, HPV.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, L. R. Prognostic impact of *p53* and *p63* immunoexpression and the HPV role in oral squamous cell carcinoma. 2008. 165p. Thesis (PhD in Experimental Patology) – Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, Brazil.

Brazil is among the countries with the largest indexes of oral squamous cell carcinoma (OSCC). The role of *p53* and *p63* in the OSCC prognosis is still debatable. The involvement of the human papillomavirus (HPV) in CEO is still another factor no elucidated. Our study aimed to evaluate the patients with OSCC diagnosed in the Teaching Hospital of the Ribeirao Preto Medical School of the Sao Paulo University, as well as to investigate the relationship between the *p53* and *p63* proteins immunoexpression and the HPV presence with some relevant clinicopathological parameters to the tumor prognostic. The data obtained from the medical files of 424 patients were: age, gender, primary tumor (PT) site and size, evolution time, tobacco and alcohol consumption, actinic radiation exposition, prosthesis trauma reports, recurrences, metastases, tumoral differentiation, treatment, survival and deaths. One hundred twenty-six patients were selected for the survival study, 106 for the immunohistochemical investigation, 45 for the IHQ analysis with matched samples (MS), and 87 for the polymerase chain reaction test of HPV and multivariate analysis. Tumors were prevalent in masculine patients around the 6<sup>th</sup> decade of life, with an increase in feminine gender and a smaller survival after this age. Tongue was the prevalent site, and the lower lip lesions had the larger delay to look for treatment and high reports of unprotected actinic exposition. There were recurrences in 30% of the patients, 28.8% had metastases and 13.2% died. Well differentiated tumors were more prevalent in this study (47.7%), and the five years disease free survival (DFS) and overall survival (OS) were 19% and 24.3%, respectively. The *p63* immunoexpression (87.8%) in tumors was higher than *p53* (52.8%), and the *p53* positive tumors were significantly associated with metastases. The *p53* negative tumors and those with strong *p63* immunoexpression intensity demonstrated better OS. In the MS study, tumors with high *p63* immunoexpression demonstrated better survival and those *p53* negative had better DFS. Most of cases demonstrated a concordant immunoexpression pattern in MS (73.3% for *p53* and 53.3% for *p63*, respectively). HPV was found in 18 (10.4%) OSCC samples, corresponding to 17 (19.5%) patients. There were positive samples in 10 (11.5%) PT and 8 (9.2%) MS. The subtypes HPV 16 and 18 were identified in 4 (22.2%) and 3 (16.7%) of the positive samples, respectively. Presence of both subtypes was found in 6 (33.3%) samples and in 5 (27.8%) samples they were not identified. The HPV positive samples were significantly associated with non-smoker patients. Significant differences related to the OSCC prognostic were found in multivariate analysis for age, tumoral site and *p53*. The *p53* immunoexpression and low intensity of *p63* immunoexpression demonstrated relation with worse prognostic, and a HPV association to oral carcinogenesis was verified in the non-smoker patients.

Keywords: oral cancer, oral squamous cell carcinoma, prognostic, survival, *p53*, *p63*, HPV.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	-	Amostras Pareadas
AgNO <sub>3</sub>	-	Nitrato de Prata
AIS	-	Amplified In Squamous carcinoma
AJCC	-	American Joint Committee on Cancer
BSA	-	Bovine Serum Albumin solution
CEO	-	Carcinoma Epidermóide Oral
CID	-	Código Internacional de Doenças
DAB	-	Diamino-Benzidina
DBD	-	DNA Binding Domain
DNA	-	Desoxyribonucleic Acid
E	-	Early genes
EEC	-	Ectrodactyly, Ectodermal dysplasia and facial Clefts
HC/FMRP	-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HPV	-	Human Papillomavírus
HSP	-	Heat Shock Protein
IARC	-	International Agency for Research on Cancer
IC	-	Intervalo de Confiança
INCA	-	Instituto Nacional de Câncer
L	-	Late genes
LCR	-	Long Control Region
ML	-	Metástase Linfonodal
OD	-	Oligomerization Domain

OMS	-	Organização Mundial da Saúde
OR	-	Odds Ratio
ORF	-	Open Reading Frame
pb	-	Pares de Base
PBS	-	Phosphate-Buffered Saline
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
SAM	-	Sterile Alpha Motif
SAME	-	Serviço de Arquivo Médico
SG	-	Sobrevida Global
SLD	-	Sobrevida Livre da Doença
TA	-	Transactivation Domain
TBE	-	Tris-ácido Bórico-EDTA
TEMED	-	Tetrametiletilenodiamina
TNM	-	Tumor-Nódulo-Metástase
TP	-	Tumor Primário
UICC	-	União Internacional Contra o Câncer
USA	-	United States of America
USP	-	Universidade de São Paulo

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Isoformas da proteína p63 (A) e porcentagem de homologia seqüencial de seus domínios funcionais com p53 (B)	44
Figura 2 – História pregressa da evolução dos tumores primários até a procura do serviço pelos pacientes (N = 398)	84
Figura 3 – História pregressa das lesões conforme a localização anatômica tumoral primária	84
Figura 4 – Relatos de exposição actínica desprotegida nos 70 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide em lábio inferior	85
Figura 5 – Sobrevida global dos pacientes estudados	87
Figura 6 – Sobrevida dos pacientes com recidivas, metástases, recidivas e metástases ou ausência de ambos	87
Figura 7 – Sobrevida dos pacientes classificados conforme a idade	88
Figura 8 – Sobrevida dos pacientes conforme as quatro localizações anatômicas tumorais primárias de maior prevalência	88
Figura 9 – Fotomicrografia de células tumorais positivas para a proteína p63 (marcação nuclear escura, imunohistoquímica, x40)	90
Figura 10 – Fotomicrografia de células tumorais positivas para a proteína p53 (marcação nuclear escura, imunohistoquímica, x40)	90
Figura 11 – Análise das curvas de sobrevida livre da doença conforme a imunoexpressão quantitativa da proteína p63	94
Figura 12 – Análise das curvas de sobrevida global conforme a imunoexpressão quantitativa da proteína p63	94
Figura 13 – Análise das curvas de sobrevida livre da doença conforme a intensidade de imunoexpressão da proteína p63	95



Figura 14 – Análise das curvas de sobrevida global conforme a intensidade de imunexpressão da proteína p63	95
Figura 15 – Análise das curvas de sobrevida livre da doença conforme a imunexpressão da proteína p53	96
Figura 16 – Análise das curvas de sobrevida global conforme a imunexpressão da proteína p53	96
Figura 17 – Comparação das curvas da sobrevida global nos pacientes estudados conforme o padrão de imunexpressão de p63 no tumor primário e em sua respectiva metástase linfonodal	100
Figura 18 – Comparação das curvas da sobrevida livre da doença nos pacientes estudados conforme o padrão de imunexpressão de p63 no tumor primário e em sua respectiva metástase linfonodal	100
Figura 19 – Comparação das curvas da sobrevida livre da doença nos pacientes estudados conforme o padrão de imunexpressão de p53 no tumor primário e em sua respectiva metástase linfonodal	101
Figura 20 – Comparação das curvas da sobrevida global nos pacientes estudados conforme o padrão de imunexpressão de p53 no tumor primário e em sua respectiva metástase linfonodal	101
Figura 21 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% dos produtos da amplificação do DNA genômico para detecção do gene da beta-globina e do DNA do HPV	106
Figura 22 – Distribuição dos pacientes com carcinoma epidermóide oral avaliados conforme o gênero e a presença do DNA do HPV	104
Figura 23 – Distribuição dos pacientes com carcinoma epidermóide oral avaliados conforme a idade e a presença do DNA do HPV	105
Figura 24 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% dos produtos da amplificação do DNA genômico para detecção e tipificação do DNA do HPV	106
Figura 25 – Sobrevida livre da doença dos pacientes com carcinoma epidermóide oral avaliados conforme a presença ou ausência do DNA do HPV	107
Figura 26 – Sobrevida global dos pacientes com carcinoma epidermóide oral avaliados conforme a presença ou ausência do DNA do HPV	108

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características das regiões regulatórias (ORFs) do HPV	53
Tabela 2 – Características clinicopatológicas dos 424 pacientes com carcinoma epidermóide oral investigados conforme a localização tumoral anatômica primária (%)	81
Tabela 3 – Distribuição dos pacientes estudados conforme o tamanho e a localização do tumor primário no momento da biópsia inicial (%)	82
Tabela 4 – Distribuição do número e porcentagem de pacientes segundo a idade e o gênero	82
Tabela 5 – Distribuição dos pacientes com ocorrência de metástases à distância conforme a localização anatômica primária e os órgãos afetados (%)	83
Tabela 6 – Características clinicopatológicas dos 126 pacientes com carcinoma epidermóide oral selecionados para o estudo da sobrevida (%)	86
Tabela 7 – Características clinicopatológicas dos pacientes selecionados para o estudo imunohistoquímico (%)	89
Tabela 8 – Distribuição quantitativa da imunexpressão da proteína p63 associada com o padrão de diferenciação tumoral e com os episódios de recidivas e metástases (%)	91
Tabela 9 – Distribuição da intensidade da imunexpressão da proteína p63 associada com o padrão de diferenciação tumoral e com os episódios de recidivas e metástases (%)	92
Tabela 10 – Distribuição da imunexpressão da proteína p53 associada com o padrão de diferenciação tumoral e com os episódios de recidivas e metástases (%)	92
Tabela 11 – Associação entre a imunexpressão das proteínas p53 e p63 nos casos estudados	93
Tabela 12 – Características demográficas e clinicopatológicas dos pacientes com carcinoma epidermóide oral selecionados para o estudo com amostras pareadas	97
Tabela 13 – Grau de diferenciação histológico tumoral em todas as amostras estudadas agrupados conforme os resultados de imunexpressão das proteínas p53 e p63 (%)	98

Tabela 14 – Resultados dos padrões de imunexpressão dos tumores primários comparados com suas respectivas metástases linfonodais, demonstrando a concordância ou discordância nos 45 pacientes avaliados (%)	99
Tabela 15 – Características clinicopatológicas dos pacientes com carcinoma epidermóide oral selecionados para o estudo de detecção do HPV	102
Tabela 16 – Características clinicopatológicas dos 17 pacientes diagnosticados com carcinoma epidermóide oral e com positividade para o DNA do HPV	103
Tabela 17 – Distribuição dos pacientes com carcinoma epidermóide oral avaliados conforme o grau de diferenciação histológico e a presença do DNA do HPV (%)	104
Tabela 18 – Presença do DNA do HPV nos pacientes com carcinoma epidermóide oral conforme o consumo de tabaco (%)	105
Tabela 19 – Sobrevida global acumulada nos 87 pacientes com carcinoma epidermóide oral conforme as variáveis investigadas	109

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	21
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	22
2.1	Câncer oral	22
2.1.1	Epidemiologia do carcinoma epidermóide oral	24
2.1.2	Etiologia do carcinoma epidermóide oral	25
2.1.3	Características clínicas	27
2.1.4	Características histopatológicas	31
2.1.5	Tratamento	33
2.1.6	Prognóstico do carcinoma epidermóide oral	34
2.2	Marcadores imunohistoquímicos	37
2.2.1	O gene <i>p53</i>	38
2.2.2	Função do gene <i>p53</i>	39
2.2.3	Expressão da proteína <i>p53</i> no carcinoma epidermóide oral	41
2.3.1	O gene <i>p63</i>	43
2.3.2	Estrutura e função do gene <i>p63</i>	43
2.3.3	O gene <i>p63</i> na proliferação e diferenciação celular	47
2.3.4	Influência do gene <i>p63</i> nas neoplasias	48
2.3.5	Expressão da proteína <i>p63</i> no carcinoma epidermóide oral	50
2.4	O Papilomavírus Humano (HPV – <i>Human Papillomavirus</i> )	51
2.4.1	Mecanismos moleculares de transformação maligna do HPV	54
2.4.2	Deteção do HPV na cavidade oral	57
2.4.3	Transmissão do HPV para a mucosa oral	61
2.4.4	Deteção do HPV por PCR em amostras parafinizadas de carcinoma	

epidermóide oral	62
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>65</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>66</b>
4.1 Aspectos éticos	66
4.2 Casuística	66
4.3 Critérios e definições	67
4.4 Estudo da sobrevida	69
4.5 Estudo imunohistoquímico	69
4.6 Estudo imunohistoquímico com amostras pareadas	71
4.7 Detecção do HPV no carcinoma epidermóide oral	72
4.7.1 Extração do DNA em amostras parafinizadas	73
4.7.2 Reação em cadeia da polimerase	73
4.7.3 Amplificação e tipificação do HPV	75
4.7.4 Separação eletroforética e análise do produto amplificado	76
4.8 Análises estatísticas	78
4.9 Reagentes e soluções	78
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>79</b>
5.1 Estudo da sobrevida	85
5.2 Estudo imunohistoquímico	88
5.3 Estudo imunohistoquímico com amostras pareadas	97
5.4 Detecção do HPV no carcinoma epidermóide oral	102
5.5 Análise multivariada dos fatores clinicopatológicos e moleculares associados ao prognóstico dos pacientes com carcinoma epidermóide oral	108
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>110</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>131</b>

<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	133
<b>9. ANEXOS</b>	153
ANEXO A. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	153
ANEXO B. Protocolo de Imunohistoquímica	154
ANEXO C. Reagentes e Soluções de Imunohistoquímica	157
ANEXO D. Protocolo para extração e purificação do DNA genômico das amostras teciduais parafinizadas com o kit Magnesil Tissue System <sup>®</sup> – Promega	160
ANEXO E. Reagentes e soluções para PCR	164

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de óbito em todo o mundo, sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares nos países desenvolvidos. Para as próximas décadas, já é esperado o dobro do número de pessoas diagnosticadas com câncer, aumentando a demanda por novos métodos diagnósticos e terapêuticos (DE MEJIA et al. 2003).

O carcinoma epidermóide oral (CEO) é a neoplasia oral maligna mais freqüente, correspondendo a cerca de 95% dos tumores orais (FORASTIERE et al., 2001). Caracteriza-se como uma doença de características heterogêneas, com padrões distintos de apresentação e comportamento. Por estes motivos, ainda não foi esclarecido porque alguns pacientes com o mesmo estadiamento tumoral e localização anatômica primária evoluem melhor do que outros.

Por sua elevada letalidade e pelas possibilidades de identificação precoce por parte da rede básica de atendimento odontológico, os pacientes acometidos pelo CEO representam um sério problema de saúde pública mundial, com maior tendência de crescimento nos países em desenvolvimento (SANKARANARAYANAN et al., 1998). Além disso, tem predomínio no gênero masculino, assim como também nos pacientes por volta da sexta década de vida. No entanto, tem sido observado um aumento na incidência em adultos jovens, assim como em pacientes do gênero feminino. As regiões anatômicas mais afetadas são a língua, o assoalho oral e o lábio inferior (GERVASIO et al., 2001).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Câncer oral

As neoplasias malignas da mucosa oral representam cerca de 10% dos tumores malignos que ocorrem no corpo humano, sendo o câncer oral o 6º tipo de câncer mais prevalente no mundo (CARVALHO, 2003; PARKIN et al., 2005). Pelo menos 95% das neoplasias orais consistem em carcinomas epidermóides, e os tumores adicionais compreendem os glandulares, os melanomas, os sarcomas e os odontogênicos. Excluindo-se o câncer de pele, o CEO pode ser considerado o mais comum da região de cabeça e pescoço (38% dos casos), predomina no gênero masculino e tem 75% dos casos diagnosticados na faixa etária dos 60 anos (COSTA ADE et al., 2002; PARKIN et al., 2005; WUNSCH-FILHO, 2002). Segundo Gervásio et al. (2001), o CEO pode ser considerado uma neoplasia da terceira idade, sendo visto esporadicamente antes da terceira e quarta década de vida.

O termo câncer oral integra na Classificação Internacional de Doenças (CID) da OMS o grupo compreendido nos seguintes códigos: C00 – Neoplasia maligna do lábio, C02 – Neoplasia maligna dos dois terços anteriores da língua, C03 – Neoplasia maligna da gengiva, C04 – Neoplasia maligna do assoalho da boca, C05 – Neoplasia maligna do palato duro, C06 – Neoplasia maligna de outras partes e de partes não especificadas da boca e C06-2 – Neoplasia maligna da área retromolar (CID-10, 1997). Para o estudo do CEO, é de fundamental importância a distinção da região da orofaringe, que inclui palato mole, base da língua, região tonsilar e faringe posterior, onde as características clínicas, o prognóstico da lesão e a sensibilidade à radioterapia são distintos. No entanto, a maioria dos estudos envolvendo lesões orais não separa as regiões anatômicas orais específicas (HA; CALIFANO, 2004; ORD, 1996). Em um artigo sobre prevenção do CEO, o próprio Instituto Nacional de



Câncer (INCA) incluiu as patologias malignas das glândulas salivares, tonsilas e orofaringe como áreas anatômicas associadas à denominação de “câncer de boca” (BRASIL, 2003).

O CEO é caracterizado como um tumor epitelial agressivo, pois apesar dos avanços terapêuticos utilizando os mais recentes protocolos cirúrgicos, radioterápicos e/ou quimioterápicos, a sobrevida dos pacientes em longo prazo permaneceu menor que 50% nos últimos 50 anos. Entre as principais causas para este prognóstico ruim está o atraso no diagnóstico da doença, sendo que geralmente o tumor é detectado quando já alcançou um estágio avançado (FORASTIERE et al., 2001).

Alguns trabalhos demonstram prognóstico ruim e taxas de sobrevida reduzidas nas populações de baixos níveis sócio-econômicos e que geralmente consomem álcool e tabaco em excesso, pois estes pacientes tendem a demorar mais para procurar cuidados profissionais (MACFARLANE et al., 1996; WUNSCH-FILHO, 2002). Desta forma, em um estudo comparando pacientes com CEO entre instituições de um país desenvolvido e de um país em desenvolvimento, foi encontrada menor sobrevida para os pacientes desta última (CARVALHO et al., 2004).

Dependendo da extensão da lesão primária e da localização anatômica específica, o CEO demonstra grande predisposição para a disseminação de metástases em linfonodos cervicais. Na prática clínica, o planejamento terapêutico e o prognóstico dos pacientes com CEO estão orientados principalmente pelo estadiamento clínico da lesão, seguindo a classificação TNM (Tumor-Nódulo-Metástase), onde o T representa o tamanho do tumor primário (maior diâmetro da lesão), o N representa a disseminação linfática regional pelo tumor e o M significa presença de doença metastática à distância (SOBIN; WITTEKIND, 2002). No entanto, o sistema TNM possui informações insuficientes sobre as características biológicas tumorais, sendo estas informações de fundamental importância para a obtenção de

novos fatores prognósticos que possam providenciar informações mais acuradas sobre a agressividade deste tipo de tumor (HIRATSUKA et al., 1997).

### **2.1.1 Epidemiologia do carcinoma epidermóide oral**

Estudos epidemiológicos demonstram que a prevalência do câncer oral varia significativamente entre os continentes, assim como também dentro de cada país, estando esta variação possivelmente relacionada com as diferenças locais de incidência dos fatores de risco (JOVANOVIC et al., 1993).

De acordo com as estatísticas de câncer mundiais, em 2002, aproximadamente 274.000 novos casos de câncer oral foram diagnosticados, cerca de 128.000 pacientes foram a óbito por este tipo de neoplasia maligna e quase dois terços dos casos foram diagnosticados no gênero masculino. A região geográfica com maior taxa bruta de incidência é a Melanésia (31,5 casos por 100.000 homens e 20,2 casos por 100.000 mulheres), seguida pelo Sul da Ásia (12,7 casos por 100.000 homens e 8,3 casos por 100.000 mulheres) e também pela alta incidência no gênero masculino no Oeste e Sul da Europa (11,3 e 9,2 casos por 100.000, respectivamente). Os padrões de incidência refletem a influência regional de fatores de risco específicos, como o alto consumo de tabaco e álcool em países do Oeste e Sul europeu, assim como o freqüente hábito de mascar folhas de betel na Melanésia e no Sul asiático (PARKIN et al., 2005). Como agravante, a folha de betel não é utilizada sozinha, sendo enrolada em conjunto com outros ingredientes, como noz de betel, cal extinta e tabaco (KAUGARS et al., 1992).

Devido ao crescente uso do tabaco, a tendência atual da incidência do câncer oral vem aumentando no gênero feminino (CARVALHO et al., 2001). Além disso, ainda não é compreendido o motivo pelo qual a incidência desta doença também é crescente em

indivíduos com idade abaixo dos 40 anos e desprovidos de exposição a qualquer fator de risco reconhecido (LINGEN et al., 2000; SCHANTZ; YU, 2002).

O Brasil está entre os países que possuem os maiores índices de câncer oral. Segundo dados do INCA, as taxas de prevalência, incidência e mortalidade para o câncer oral em algumas áreas no Brasil estão entre as mais altas do mundo, sendo a região de maior prevalência a Sudeste, seguida da região Sul. O câncer oral representa o 8º tipo de câncer mais freqüente, sendo a 6ª neoplasia maligna mais comum do gênero masculino e a 8ª do feminino. Para o ano de 2006, as estimativas do INCA indicaram cerca de 13.470 novos casos, com 10.060 casos acometendo o gênero masculino e 3.410 o feminino, sendo 60% deles na região Sudeste (BRASIL, 2006).

O estado de São Paulo é considerado uma região endêmica para o câncer oral, porque possui uma das maiores taxas brutas de incidência no país para cada 100.000 habitantes, sendo de 17,20 e 4,17 para o gênero masculino e feminino, respectivamente. Além disso, concentra 32% e trata cerca de 42% de todos os casos do país (BRASIL, 2006). A cidade de São Paulo, possui a maior taxa bruta de incidência para cada 100.000 habitantes do continente americano, com 19,45 e 5,05 para o gênero masculino e feminino, respectivamente (BRASIL, 2006; WUNSCH-FILHO, 2002). Devido a estes altos números, através do Projeto de Lei 703/05 (30/09/2005), ficou instituída a "Semana Estadual de Prevenção e Combate ao Câncer Oral", que ocorre anualmente de 24 a 31/05, no estado de São Paulo.

### **2.1.2 Etiologia do carcinoma epidermóide oral**

Apesar de ainda não haver uma clara compreensão sobre a etiologia do câncer, vários fatores determinantes têm sido detectados e investigados. O conhecimento dos fatores de risco constitui a base para uma prevenção efetiva da doença. De acordo com Braakhuis et al. (2002), no caso do CEO, não há um agente ou fator causal isolado, claramente definido ou

aceito, sendo por este motivo mais provável que dois ou mais fatores sejam necessários para produzir a malignidade, causando um acúmulo de alterações genéticas que são a base para o desenvolvimento e progressão do CEO.

Mesmo sendo o CEO uma doença multifatorial, o consumo de tabaco e álcool são os dois fatores de risco mais evidentes e importantes não só para o desenvolvimento da neoplasia, como também para a disseminação de metástases e para o prognóstico geral do paciente. Além disso, a exposição crônica desprotegida à radiação ultravioleta também é considerada um fator etiológico evidente nos casos de CEO em lábio inferior (BUNDGAARD et al., 1994; MANSOUR et al., 2003).

Outros fatores contribuintes que têm sido implicados na etiologia do CEO são: genética e estado sistêmico do indivíduo, meio ambiente com seus efeitos sociais e comportamentais, irritação crônica (como as originadas de próteses mal ajustadas ou dentes quebrados), higiene oral deficiente, calor (fumo do cachimbo e charuto), exposição a radiações e atrofia da mucosa oral na síndrome de Plummer-Vinson (VELLY et al., 1998). Uma outra influência predisponente, mas em nível regional, é a dos mascaradores de betel na Índia e em outras partes da Ásia (BALARAM et al., 2002).

De acordo com Carvalho et al. (2004), estes fatores de risco associados com a herança genética podem gerar um efeito carcinogênico sobre as células normais da mucosa oral, pois existem evidências epidemiológicas cada vez maiores de que um histórico familiar de câncer de cabeça e pescoço é um fator de risco à doença, sendo postulado que a instabilidade genômica herdada pode aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento do CEO (JEFFERIES; FOULKES, 2001).

Apesar do consumo do tabaco e do álcool estar implicado como o principal fator de risco para a etiologia do CEO, este tumor pode também desenvolver-se em indivíduos sem história de exposição a estes fatores (DAHLSTROM et al., 2003). Além disso, somente uma

pequena proporção de indivíduos expostos a estes fatores desenvolve a neoplasia, havendo cada vez mais uma população emergente desprovida desta exposição e com a incidência do tumor, sugerindo a influência de outros fatores que podem desempenhar um papel etiológico na carcinogênese oral (BALARAM et al., 1995; SCULLY, 2002).

Mesmo com a alta prevalência desta doença em nosso país, estudos populacionais relativos ao CEO e seus fatores de risco são surpreendentemente escassos no Brasil (GERVASIO et al., 2001; WUNSCH-FILHO, 2002).

### **2.1.3 Características clínicas**

De acordo com Kowalski e Souza (2001), os indivíduos com CEO geralmente percebem alguma alteração e procuram cuidados terapêuticos profissionais em média após quatro a oito meses do início da lesão, aumentando para até 24 meses nos grupos socioeconômicos mais baixos. Uma dor mínima ocorre na fase inicial de crescimento, sendo um dos principais fatores implicados no atraso do diagnóstico.

Os sinais e sintomas do CEO geralmente estão associados às queixas relacionadas com feridas que não cicatrizam, nos lábios e/ou na boca. Ulcerações superficiais com menos de dois centímetros de diâmetro também podem ocorrer, podendo ser indolores e com ausência ou presença de sangramento. Outros sinais e sintomas relacionados são: manchas brancas e/ou avermelhadas na mucosa oral, dor ou desconforto à mastigação e deglutição, dificuldade na fala, emagrecimento acentuado e presença de linfadenomegalia cervical (BRASIL, 2003).

O CEO pode incidir em qualquer parte da mucosa oral, porém, a língua, o assoalho oral e o lábio inferior são os locais mais acometidos pelas lesões nas pesquisas epidemiológicas. Outros locais de envolvimento menos freqüente são: palato duro, mucosa retromolar, mucosa jugal e gengiva (GERVASIO et al., 2001).

Segundo Antoniades et al. (1995), o CEO labial é tipicamente encontrado em pessoas com exposição crônica desprotegida à radiação ultravioleta, sendo que a maioria dos pacientes afetados trabalha ao ar livre (70%). As lesões podem também surgir no local onde cigarro, cachimbo ou charuto entram em contato com a mucosa labial e quase 90% delas surgem no lábio inferior.

A história natural do CEO envolve a progressão sequencial através de aspectos clinicopatológicos iniciais, começando por uma proliferação atípica, progredindo para uma displasia, carcinoma *in situ* e depois para um carcinoma invasivo, culminando em metástase. No entanto, este tipo de neoplasia geralmente pode demorar de meses a anos para progredir através destes estágios, sendo de fácil acesso ao diagnóstico por biópsia antes de atingir seus estágios avançados de incurabilidade (MASHBERG; SAMIT, 1989).

O diagnóstico das displasias da mucosa oral é extremamente importante na prática clínica diária, entretanto, sua aparência clínica pode ser bastante variável. Indivíduos com lesões displásicas na cavidade oral possuem de 10 a 20% de chances de progressão para um CEO. As lesões displásicas podem apresentar-se como lesões pré-cancerosas, na forma de leucoplasia ou eritroplasia (LUMERMAN et al., 1995; SPEIGHT; MORGAN, 1993).

A leucoplasia, geralmente um sinal ou uma placa branca associada com o uso do tabaco ou de origem idiopática, é a lesão pré-cancerosa mais comumente encontrada na cavidade oral (WARNAKULASURIYA, 2001). O diagnóstico da leucoplasia é feito quando uma lesão branca encontrada durante o exame clínico não pode ser claramente diagnosticada como qualquer outra doença da mucosa oral que possa apresentar uma aparência branca, e, de acordo com van Der Wall et al. (1997), deve ser confirmado pelo exame histológico para exclusão de quaisquer outras doenças mucosas ou malignidades, e também para estabelecer a presença ou ausência de displasia epitelial.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define as leucoplasias como tecidos morfológicamente alterados com maior susceptibilidade de ocorrência do câncer (WHO, 1997). Segundo Silverman et al. (1984), a presença e o grau da displasia epitelial são reconhecidos como importantes na avaliação do potencial cancerígeno de uma lesão, contudo, estes diagnósticos podem diferir conforme a subjetividade e a experiência dos investigadores. Em geral, leucoplasias orais com características verrucosas, nodulares ou eritematosas são acompanhadas de maior risco de malignização (WARNAKULASURIYA, 2001).

Assim como a leucoplasia, a eritroplasia é definida como uma placa vermelha que não pode ser diagnosticada de maneira clínica ou patológica como qualquer outra condição. Além disso, ambas as condições podem aparecer em associação. Entretanto, apesar de ser menos comum que a leucoplasia, existe um maior potencial da descoberta de displasia significativa, carcinoma *in situ* ou invasivo em biópsias de eritroplasias. A mucosa alterada aparece como uma mácula ou placa eritematosa bem demarcada e assintomática, com uma textura macia e aveludada. Apesar de uma significativa proporção dos carcinomas escamosos da mucosa de revestimento da cavidade oral originar-se de superfícies epiteliais displásicas, a malignidade também pode originar-se de um epitélio desprovido destas alterações, dificultando sobremaneira o diagnóstico precoce da doença (CASIGLIA; WOO, 2001).

Segundo Casiglia e Woo (2001), as lesões do CEO podem ter apresentação clínica variada, podendo apresentar-se como: exofíticas (formadoras de massa), endofíticas (com ulcerações), leucoplásicas (placas brancas), eritroplásicas (placas vermelhas) e/ou eritroleucoplásicas (placas vermelhas e brancas). Nos primeiros estágios, o CEO pode apresentar-se como uma placa nacarada, elevada e firme ou como uma área de espessamento mucoso, irregular, grosseira e áspera. Uma área verrucosa de espessamento mucoso pode ser confundida com uma leucoplasia, mas também pode representar o tumor em estágio inicial. Muitas vezes, as alterações aparecem sobre uma base de eritroplasia ou leucoplasia. Com a

progressão, a lesão pode sofrer ulceração e necrose central, podendo ser delimitada por bordos elevados, hiperêmicos, firmes, duros e irregulares ou arredondados. Com o decorrer do tempo, as úlceras tornam-se maiores e mais profundas, com extensão para os tecidos circunjacentes e, possivelmente, fixação às estruturas anatômicas adjacentes (MASHBERG; SAMIT, 1989). A destruição do osso subjacente, quando presente, pode ser dolorosa ou completamente sem dor, aparecendo nas radiografias como uma radiotransparência com aspecto de “roída por traças”, com margens rotas e maldefinidas. Em estágios avançados, os sintomas podem incluir dor, dificuldades na fonação e deglutição, comprometimento das vias aéreas e disfunções de nervos craniofaciais (CASIGLIA; WOO, 2001; FORASTIERE et al., 2001).

De maneira geral, estes tumores tendem a se infiltrar localmente antes de disseminarem metástases. Porém, quando não diagnosticado em seu estágio inicial, o CEO pode propagar-se regionalmente para os linfonodos submandibulares e jugulares superiores internos, conforme o modelo anatômico do fluxo linfático na região cervical, podendo disseminar posteriormente para sítios mais distantes (OKADA et al., 2003; WOOLGAR, 1999). Os lugares mais favoráveis de metástases à distância são os pulmões, o fígado, os ossos e os linfonodos mediastinais. Contudo, muitas vezes as metástases regionais e distantes podem estar ocultas no momento da descoberta da lesão primária, afetando sobremaneira o prognóstico dos pacientes (ASAKAGE et al., 1998; OKADA et al., 2003). Por outro lado, na literatura existem outros estudos evidenciando a ocorrência de linfonodos cervicais patologicamente positivos em pacientes sem evidências clínicas da doença (HICKS et al., 1998; LYDIATT et al., 1993).

Outra característica clínica importante e que influi no prognóstico dos pacientes com a doença é a alta frequência de formação de tumores primários múltiplos, que levou ao conceito de cancerização em campo, primeiramente utilizado por Slaughter et al. (1953). Em um trabalho clássico sobre o assunto, os autores examinaram cortes histológicos tumorais de 783



pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço, numa tentativa de compreender as principais e mais evidentes alterações encontradas no epitélio adjacente aos tumores e, desta forma, explicar seu comportamento clínico. Foi descoberto então que todas as áreas além do limite tumoral possuíam alterações histológicas e que 88 (11%) pacientes possuíam mais do que uma área independente de malignidade. Os autores concluíram que a mucosa do trato digestivo superior poderia ter sido submetida a alterações após anos de exposição crônica a carcinógenos, se tornando suscetível ao desenvolvimento de diversos focos neoplásicos independentes, com potencial para formação de múltiplas lesões que às vezes coalescem. Devido a este fato, um indivíduo que viver cinco anos após o diagnóstico do tumor primário inicial tem até 35% de chances de desenvolver um novo tumor primário dentro daquele período de tempo (SLAUGHTER et al., 1953).

A interpretação de que pequenos e independentes focos tumorais coalescem em um único tumor é questionável. Entretanto, o conceito de que alterações pré-cancerosas se estendem além da área macroscopicamente visível do tumor é bastante válida e considerada nos dias atuais (BRAAKHUIS et al., 2002)

#### **2.1.4 Características histopatológicas**

No exame histológico, o CEO pode começar como uma lesão displásica, que pode ou não evoluir para uma displasia de toda espessura do epitélio (carcinoma *in situ*) previamente à invasão do estroma conjuntivo subjacente. No entanto, o padrão normal de evolução é o CEO começar histologicamente como uma lesão *in situ*, algumas vezes com áreas circundantes de atipia epitelial ou displasia. Com a progressão, o carcinoma *in situ* rompe-se através da membrana basal e invade o tecido conjuntivo subjacente, geralmente sendo cercado por um infiltrado inflamatório proeminente. Estas neoplasias podem variar desde carcinomas ceratinizantes bem diferenciados até lesões altamente indiferenciadas (ANNEROTH et al.,

1986). É considerado bem diferenciado quando faz lembrar a estrutura na qual foi originado, no caso, um epitélio escamoso, apresentando tendência das células para a ceratinização. O tumor é dito moderadamente diferenciado quando essas células são visualizadas em menor intensidade e é denominado de pouco diferenciado quando os caracteres histológicos e citológicos vagamente lembram as estruturas oriundas do epitélio escamoso (BRASIL, 2001).

Segundo Anneroth et al. (1986), o CEO surge no epitélio superficial e é histopatologicamente caracterizado por ilhas e cordões invasivos de células epiteliais malignas, que mostram diferenciação em direção a uma morfologia escamosa. As células tumorais geralmente apresentam núcleos grandes, com um aumento da razão núcleo-citoplasma. São vistos graus variados de pleomorfismo celular e nuclear, com pérolas de ceratina produzidas por células individuais ou ilhas de epitélio escamoso. Podem ocorrer mudanças no estroma circundante, com a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e de um infiltrado de células inflamatórias crônicas. Ocasionalmente, um colágeno consideravelmente denso também pode ser encontrado. Além disso, o CEO pode variar de um neoplasma ceratinizado bem diferenciado até um tumor anaplásico, podendo apresentar características basalóides e algumas vezes até apresentar um padrão sarcomatóide.

De acordo com D'cruz e Mulherkar (2005), o grau de diferenciação, a profundidade de infiltração, a presença de invasão perineural ou linfo-vascular, o envolvimento linfonodal e a extensão extra-capsular da doença são considerados importantes parâmetros histológicos para identificação do subgrupo de pacientes com pobre prognóstico. No entanto, como a resposta terapêutica pode variar amplamente entre os pacientes, outras características são requeridas para a identificação do grupo de tumores de alto risco, objetivando a otimização dos tratamentos padronizados contra o CEO.

### 2.1.5 Tratamento

As alternativas terapêuticas são estratificadas em sua maioria conforme o estadiamento clínico tumoral. A terapia do CEO está baseada em tratamentos cirúrgicos ou radioterápicos quando o tumor encontra-se em seus estágios clínicos iniciais, enquanto as lesões avançadas respondem melhor ao tratamento combinado entre ambos. Entretanto, nem sempre a evolução clínica segue o padrão clinicopatológico esperado (BRADY, 1988; CARVALHO et al., 2003).

É importante observar que o tratamento do CEO, realizado através de cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia, pode ser comprometido em pacientes com precárias condições de higiene oral, pois são bastante estabelecidos e conhecidos na literatura os danos da osteorradionecrose, mucosite e xerostomia nos pacientes em tratamento pela doença (COSTA, 2005).

A cirurgia para ressecção dos tumores primários deve incluir sempre toda a lesão tumoral, além das margens adjacentes de tecido livre. A radioterapia de lesões extensas deve incluir também as cadeias de drenagem linfática, mesmo quando clinicamente elas não estejam acometidas. Portanto, as opções de tratamento variam conforme o estágio clínico das lesões (BRASIL, 2002).

Apesar dos avanços terapêuticos, a sobrevida dos pacientes tratados não tem aumentado significativamente nas últimas duas décadas, configurando-se como as principais razões para este fato os altos índices de recorrências e metástases observados nos pacientes com tumores não responsivos às alternativas terapêuticas utilizadas (CARVALHO et al., 2003; WOOLGAR, 1999).

De acordo com Oliver et al. (1996), a quimioterapia no tratamento do CEO somente é utilizada em protocolos de preservação de órgão, adjuvância à radioterapia ou como um agente paliativo para os sintomas dos pacientes. Os agentes químicos citotóxicos comumente

utilizados são: metotrexato, cisplatina, carboplatina, fluororacil, paclitaxel e docetaxel (FORASTIERE et al., 2001).

Uma das promissoras abordagens terapêuticas em teste associadas à biologia molecular é a injeção intralesional do adenovírus ONYX-015, que tem a capacidade de replicar seletivamente e causar lise nas células tumorais deficientes da atividade do gene supressor tumoral P53, não proliferando nas células normais (DAS; NAGPAL, 2002; HEISE et al., 1999).

O tratamento desse tipo de câncer pode implicar em mutilação que muitas vezes inabilita o paciente, podendo resultar em graves conseqüências funcionais, psicológicas e sociais para o indivíduo (KOWALSKI; NISHIMOTO, 2000). Por este motivo, um efetivo sistema de suporte psicológico, juntamente com uma experiente equipe de profissionais especializados de diversas áreas, torna-se imprescindível para a reabilitação do paciente acometido pelo CEO (FORASTIERE et al., 2001).

### **2.1.6 Prognóstico do carcinoma epidermóide oral**

Apesar dos avanços terapêuticos que conduziram a um melhor controle local da neoplasia, o índice de sobrevida dos pacientes com CEO pouco melhorou nas últimas décadas (VOKES et al., 1993).

Os principais fatores prognósticos comumente reconhecidos no CEO incluem a localização anatômica da lesão primária e o estadiamento clínico TNM do paciente. No entanto, embora úteis, estes fatores nem sempre possibilitam uma discriminação definitiva entre pacientes de baixo e alto risco. Dentre os demais fatores que determinam o prognóstico deste tipo de neoplasia, estão também a escolha terapêutica e a diferenciação histológica tumoral (OKADA et al., 2003).

Por outro lado, outros autores relataram não haver correlação entre o estágio clínico e a classificação histológica da lesão primária no prognóstico desta neoplasia (ANNEROTH et al., 1986; WILLEN et al., 1975), o que levou outros trabalhos a também considerarem a espessura tumoral como um indicador prognóstico tumoral (MOHIT-TABATABAI et al., 1986; SPIRO et al., 1986).

Assim como em outros tipos de neoplasias malignas, o diagnóstico precoce constitui um dos fatores prognósticos de maior importância, sendo o avançado estágio da doença no momento diagnóstico um dos mais importantes fatores determinantes de um prognóstico ruim. Segundo a maioria dos autores, a mortalidade aumenta em relação ao estágio clínico em que o diagnóstico da neoplasia é feito. Portanto, a detecção precoce, ao lado do tratamento adequado, configuram-se como fatores essenciais na prevenção das mortes prematuras pela doença, além de reduzir o desfiguramento estético e as seqüelas funcionais dos pacientes (OLIVER et al., 1996).

Para os pacientes submetidos aos tratamentos padronizados, a taxa de recidiva tumoral varia de 18 a 76%, podendo ser influenciada por fatores como localização anatômica, estadiamento clínico, características histológicas e tratamento (SHAH; LYDIATT, 1995). De acordo com Gillison et al. (2000), a maioria dos casos de recidiva tumoral no CEO ocorre no período dos 18 primeiros meses após o diagnóstico, sendo de mau prognóstico e raramente tratáveis as recidivas que ocorrem de maneira precoce após a ressecção cirúrgica. O prognóstico é melhor nas lesões labiais, cuja taxa de cinco anos isentos de recidiva é de cerca de 90%. Por outro lado, o prognóstico é mais sombrio para os tumores de assoalho oral e base da língua, associados a uma taxa de cinco anos livres de recidiva que varia de 20 a 30% (VOKES et al., 1993). Além disso, o desenvolvimento de múltiplos tumores primários nos pacientes com esta doença foi relatado ser de 3 a 7% ao ano, maior que qualquer outra malignidade. Em consequência disto, uma significativa redução na sobrevida dos pacientes

pode ocorrer, demonstrando uma influência direta do processo de cancerização em campo no prognóstico dos pacientes (ANDERSON et al., 2001).

A maioria das metástases linfáticas do CEO é encontrada nos linfonodos cervicais, sendo considerado por vários autores como outro significativo fator prognóstico da doença (JONES et al., 1994; SHAH et al., 1990). A incidência de metástases em linfonodos cervicais varia de 35,3 a 60% nos pacientes acometidos pelo CEO. Além disso, esta incidência difere de acordo com o sítio da lesão primária, sendo relatada uma taxa de 37 a 55% na língua, 11-50% na gengiva mandibular e 24-75% na mucosa do assoalho oral (NAKAYAMA et al., 1999; WOOLGAR, 1999). Entretanto, alguns pacientes apresentam metástases linfonodais cervicais originárias de lesões mucosas primárias que podem estar clinicamente ocultas (FORASTIERE et al., 2001). As metástases à distância são observadas em 15 a 20% dos pacientes, acometendo na maioria das vezes os pulmões e o fígado (BRANDÃO et al., 2000).

Considerando em conjunto todas as regiões anatômicas que podem ser acometidas, o índice de sobrevida em cinco anos do CEO em estágio inicial é de aproximadamente 80%, enquanto a sobrevida cai para 19% na doença em estágio avançado (VOKES et al., 1993; FORASTIERE et al., 2001). Em geral, a taxa de sobrevida em cinco anos chega a cerca de 45 a 50% (CARVALHO et al., 2003). O prognóstico declina com o aumento de tamanho e estágio clínico do tumor, sendo o diagnóstico precoce e o tratamento adequado essenciais para prevenção de mortes prematuras, desfiguramentos estéticos e seqüelas funcionais causadas pela doença.

O CEO localizado no lábio inferior é caracterizado por um crescimento lento e tende a disseminar sua metástase mais tardiamente, com menos de 2% dos pacientes presentes no diagnóstico com linfonodos envolvidos. Por este motivo, demonstra a mais favorável taxa de sobrevida em cinco anos (de 85 a 90%). No entanto, quando a lesão está localizada no assoalho oral ou na parte anterior da língua, as metástases ocorrem de maneira mais precoce, e

a sobrevida em cinco anos dos pacientes é reduzida para a faixa de 25 a 65% (ANTONIADES et al., 1995).

Considerando a facilidade de acesso ao diagnóstico das lesões orais e a relativa demora na progressão da lesão displásica para o carcinoma *in situ* e depois para o carcinoma invasivo, cada morte provocada pelo CEO pode ser considerada uma falha clínica ou do sistema de educação sanitária, uma vez que a presença das lesões na maioria das vezes já era conhecida há muito tempo antes que fosse determinada sua verdadeira natureza (FORASTIERE et al., 2001).

## **2.2. Marcadores imunohistoquímicos**

Os avanços nas investigações das alterações moleculares que ocorrem nas células submetidas à transformação maligna ajudam a desvendar os mecanismos da ocorrência e progressão dos tumores. Neste sentido, a identificação da expressão de moléculas específicas associadas ao processo carcinogênico tem conduzido ao conhecimento de um crescente número de marcadores moleculares que demonstram relação com as características das neoplasias malignas, complementando os parâmetros clínicos e histológicos tradicionalmente utilizados para identificar o grupo dos pacientes de alto risco, que possuem um curso clínico mais agressivo da doença. A caracterização do CEO através de marcadores moleculares específicos pode esclarecer as variações individuais no curso clínico dos pacientes, ajudando em estimativas mais confiáveis sobre o prognóstico da doença e orientando as condutas terapêuticas (SCHLIEPHAKE, 2003).

### **2.2.1. O gene *p53***

O gene *p53* foi inicialmente concebido como um possível oncogene devido a sua capacidade de transformar fibroblastos (LANE; CRAWFORD, 1979). As anormalidades ou a inativação do gene *p53* têm sido apontadas como os defeitos genéticos mais comuns no câncer humano (MOLL et al., 2001) e em mais da metade dos tumores de cabeça e pescoço são encontradas alguma forma de mutação deste gene (BOYLE et al., 1993). É um conhecido gene supressor tumoral em mamíferos, localizado em 17p13.1, controla respostas cruciais ao estresse celular desenvolvidas pelos muitos tipos de danos ao DNA (ex: radiação UV, hipóxia) e estimulações oncogênicas, que conduzem à sua ativação (MOLL et al., 2001). Recebe esse nome porque codifica uma proteína nuclear de 53 kd (SIRVENT et al., 2001), primeiramente identificado por Lane e Crawford (1979), através da associação nuclear de sua proteína com o vírus tumoral SV40.

A organização genômica do gene *p53* apresenta-se altamente conservada entre as diferentes espécies, possui aproximadamente 20 kb e contém 11 exons e 393 códons. A região com propriedade de ativação da transcrição está localizada na extremidade N-terminal de seu produto gênico (SOUSSI; MAY, 1996).

A complexidade deste gene aumentou recentemente, quando Bourdon et al. (2005) estabeleceram que o gene humano *p53* pode codificar ao menos nove diferentes isoformas de proteínas (*p53*, *p53* $\beta$ , *p53* $\gamma$ ,  $\Delta$ 133*p53*,  $\Delta$ 133*p53* $\beta$ ,  $\Delta$ 133*p53* $\gamma$ ,  $\Delta$ 40*p53*,  $\Delta$ 133*p53* $\beta$  e  $\Delta$ 133*p53* $\gamma$ ), que podem ser originadas a partir de dois sítios distintos de transcrição, além de também serem influenciadas por promotores e *splicings* alternativos. Além disso, as isoformas da proteína *p53* possuem diferentes localizações intra-celulares, sugerindo possíveis atividades biológicas específicas (BOURDON, 2007). Algumas investigações já confirmaram a detecção e a expressão anormal de algumas isoformas da proteína *p53* na leucemia mielóide aguda (ANENSEN et al., 2006), em neuroblastomas (GOLDSCHNEIDER et al., 2006) e nos



tumores de cabeça e pescoço ( $p53\beta$ ,  $p53\gamma$ ,  $\Delta 133p53$ ,  $\Delta 133p53\beta$  e  $\Delta 133p53\gamma$ ) (BOLDRUP et al., 2007).

### 2.2.2. Função do gene *p53*

As diferentes isoformas da proteína *p53* recentemente descobertas talvez possam justificar suas múltiplas funções biológicas. O gene *p53* controla o ciclo celular de células normais, regulando pelo menos dois estágios na resposta às injúrias ao DNA: As transições G1/S e G2/M (KASTAN et al., 1992). Quando ocorrem danos ao DNA, a ativação do gene *p53* pode estimular a parada do ciclo celular nestes estágios, a apoptose, ou, em algumas circunstâncias, a senescência, prevenindo por meio disso a formação de tumores (HIBI et al., 2000; MOLL et al., 2001). O retardo na progressão do ciclo celular permite que o DNA lesado seja reparado antes da célula entrar na fase S ou na fase M. No entanto, se o dano ao DNA for muito extenso, dificultando o reparo, a célula entra no processo de apoptose (FISHER, 2001). Por outro lado, nos casos de inativação do gene P53, as células podem progredir para a fase S sem reparo do DNA danificado, resultando em instabilidade genômica e permitindo o acúmulo de novas mutações (MOLL et al., 2001).

A função do gene *p53* no controle do ciclo celular na fase G2 foi demonstrada por Shen et al. (1996), investigando as células em diferentes fases de seu ciclo, antes da ativação de P53. A análise por citometria de fluxo revelou, nesses casos, que a indução deste gene em células sincronizadas na fase G1/S fazia com que estas parassem na fase G2. Portanto, a forma selvagem de *p53* pode bloquear a progressão do ciclo celular tanto na fase G1 quanto em G2, dependendo do momento em que ocorre sua superexpressão.

Os genes que podem ser induzidos ou suprimidos pelo *p53* podem ser divididos em inibidores do ciclo celular e relacionados a apoptose. Dentre os inibidores do ciclo celular, os mais importantes são o inibidor de proteína quinase dependente de ciclina ( $p21^{WAF1/CIP1}$ ) e a

proteína de parada do crescimento e dano no DNA (GADD45). Os genes relacionados a apoptose incluem *Bax* (pro-apoptótico) e *Fas/APO1* (codifica o receptor transmembranar CD95 da superfície celular, importante em um dos sistemas que promovem a morte celular) (KANNAN et al., 2000). Também existem evidências de que o *p53* modula a expressão do PCNA, em resposta à lesão genômica (KROPVELD et al., 1996).

De acordo com Borresen-Dale (2003), a perda das funções do gene *p53* elimina a resposta de parar o ciclo celular quando há dano no DNA, permitindo a replicação de um molde de DNA anormal. Como consequência, espera-se que tumores com mutações em *p53* tenham uma alta frequência de mutações em outros genes, além da expressão alterada de genes alvos do *p53*. A inibição da síntese de DNA durante a indução de genes responsáveis pelo reparo do DNA pode ser explicada pelo conceito de que o *p53* é o guardião molecular do genoma (KANNAN et al., 2000).

O tipo selvagem da proteína p53 está presente no núcleo de todas as células dos mamíferos, tendo um papel central na modulação de respostas celulares e fatores citotóxicos. É uma fosfoproteína com 53 kd, sendo composta por 393 aminoácidos (PAVLETICH et al., 1993). Níveis aumentados desta proteína podem bloquear o ciclo celular ou desencadear a apoptose, prevenindo a replicação de células com DNA danificado.

A proteína p53 selvagem tem uma meia-vida curta, de aproximadamente seis a 20 minutos, enquanto sua forma alterada tem meia vida de até seis horas. A eventual detecção de uma pequena quantidade da forma selvagem de p53 é o resultado de um processo dinâmico entre expressão, estabilização e degradação desta proteína. Mediadores positivos e negativos regulam precisamente a estabilidade e a atividade de p53. A estabilização da proteína p53, com aumento da sua expressão, pode ocorrer em resposta a vários agentes que causam dano ao DNA, acarretando mudanças conformacionais, ativação e acúmulo nuclear dessa proteína (HUPP et al., 2000). A alta concentração desta proteína nas células tumorais ocorre devido à

formação de um complexo com outros tipos de proteínas, como o produto do *MDM2* e proteínas do choque térmico, essa interação aumenta a meia-vida de p53 em muitas horas, permitindo a detecção de seu acúmulo nuclear (FINLAY et al., 1988). Esse acúmulo pode ser detectado pelo método de reação imunohistoquímica (IHQ) utilizando-se anticorpos monoclonais disponíveis no mercado, direcionados a epítomos de p53 mutado ou selvagem.

Em condições normais, a detecção de p53 selvagem por IHQ pode ocorrer em algumas células em resposta ao dano no DNA (BORRESEN-DALE, 2003). Segundo Geisler et al. (2001), a correlação entre o acúmulo nuclear de p53 medido IHQ e mutações no gene *p53* detectadas por sequenciamento é menor que 75%. A razão para isso é que nem todas as mutações produzem uma proteína estável e outras podem resultar em proteínas truncadas que podem não ser detectadas por IHQ. Outras vezes, no entanto, proteínas não mutadas, porém ligadas a outra proteína celular (formando compostos inativos truncados), podem dar um resultado positivo somente na IHQ. Segundo Wynford-Thomas (1992), a acurácia da IHQ na detecção da proteína p53 pode ser considerada similar a outras metodologias mais sofisticadas de biologia molecular.

### **2.2.3. Expressão da proteína p53 no carcinoma epidermóide oral**

As alterações na expressão da proteína p53 são as anormalidades genéticas mais frequentemente detectadas nos carcinomas de cabeça e pescoço, assim como no CEO (BRAITHWAITE et al., 2005). Brennan et al. (1995) demonstraram que os pacientes que possuem tumores associados com a exposição aos maiores fatores etiológicos do CEO – o tabaco e o álcool – possuem um aumento significativo na prevalência de mutações do gene P53 em relação aos pacientes não expostos.

Ao investigarem retrospectivamente a imunoexpressão da proteína p53 em 129 amostras parafinizadas de CEO, Famulski et al. (2002) encontraram positividade em 75 (58%)

dos casos estudados. No entanto, não encontraram associações estatisticamente significativas entre o acúmulo da expressão de p53 e variáveis como localização anatômica, idade, gênero, graduação histológica, índice mitótico e padrão invasivo da margem tumoral, sugerindo que o aumento da imunexpressão de p53 não desempenha um papel relevante na progressão tumoral do CEO.

A participação do acúmulo da expressão da proteína p53 na progressão tumoral do CEO, assim como também no prognóstico da doença, é um tema abordado em diversas e discordantes pesquisas, pois ainda não existe um consenso na literatura atual em relação a influência das alterações do gene *p53* encontradas na neoplasia (GONZALEZ-MOLES et al., 2001; GRABENBAUER et al., 2000; SAUTER et al., 1992; SITTEL et al., 1999). Entre as maiores dificuldades na interpretação destes dados estão as diferenças amostrais e as disparidades entre as técnicas laboratoriais utilizadas (KOONTONGKAEW et al., 2000; VORA et al., 2003).

Apesar das divergências, na maioria dos estudos a detecção da proteína p53 tem sido associada a um pior prognóstico. Avaliando apenas carcinomas epidermóides de língua, Unal et al. (1999) observaram que as alterações na expressão de p53 podem promover um potencial metastático às células neoplásicas, muitas vezes aparecendo antes da ocorrência de metástases. De acordo com van Houten et al. (2002), uma criteriosa avaliação das alterações na expressão da proteína p53 nas margens cirúrgicas adjacentes aos tumores excisados pode identificar pacientes com alto risco de recorrência tumoral e, segundo Lowe et al. (1994), os defeitos no funcionamento do gene *p53* podem predizer uma resistência à quimioterapia nos pacientes com a doença.

### 2.3.1. O gene *p63*

A importância do *p53* na homeostase normal da célula e na gênese tumoral direcionou a pesquisa de seus genes homólogos, provavelmente oriundos de um gene ancestral comum (HIBI et al., 2000; STRANO et al., 2001). Após cerca de 20 anos da descrição do gene *p53*, seus dois homólogos – *p63* e *p73* – foram identificados com base em uma identidade compartilhada de seus três maiores domínios funcionais: domínio de transativação (TA), domínio de ligação ao DNA (DBD, do inglês: *DNA Binding Domain*) e domínio de oligomerização (OD, do inglês: *Oligomerization Domain*). Além desses três domínios, os genes *p63* e *p73*, assim como o *p53*, contêm na sua extremidade C-terminal um domínio de interação proteína-proteína conhecido como *sterile alpha motif* (SAM) (YANG et al., 1998). Na época, a descoberta destes homólogos gerou grande expectativa em relação a suas funções biológicas, enquanto o gene *p53* possui como principal função responder às agressões ao DNA, o *p63* parece ser essencial ao desenvolvimento e diferenciação de determinados tecidos (DE LAURENZI; MELINO, 2000). Funções específicas são associadas a estes genes, íntimas reações bioquímicas cruzadas entre os membros desta família sugerem uma rede funcional que pode influenciar diferentes aspectos da ação individual de cada gene. Atualmente, sabe-se também que os genes *p53* e *p63* possuem similaridades e diversidades, pois podem codificar proteínas com funções completamente novas ou relacionadas. Contudo, estas últimas são mais complexas, porque podem ser de natureza agonista ou antagonista com o P53 (MOLL et al., 2001).

### 2.3.2. Estrutura e função do gene *p63*

O gene *p63*, localizado em 3q27-9, é freqüentemente submetido a promotores e regiões de *splicing* alternativos. Possui dois promotores que produzem duas classes de proteínas, uma contendo o domínio de TA N-terminal (TA<sub>p63</sub>) e outra destituída deste

domínio ( $\Delta$ Np63) (MOLL et al., 2001; YANG et al., 1998). Além disso, cada classe de suas proteínas é também submetida a *splicings* alternativos em sua extremidade C-terminal, podendo omitir um ou vários exons, originando então três isoformas para cada uma de suas duas classes de proteínas codificadas (TAp63 $\alpha$ , TAp63 $\beta$ , TAp63 $\gamma$  e  $\Delta$ Np63 $\alpha$ ,  $\Delta$ Np63 $\beta$ ,  $\Delta$ Np63 $\gamma$ ) (MOLL et al., 2001; YANG et al., 1998). Em adição a estas seis isoformas produzidas, uma forma truncada da isoforma  $\Delta$ Np63, a  $\Delta$ Np63<sup>p40</sup>, tem sido descrita com a ausência completa da extremidade C-terminal (YAMAGUCHI et al., 2000). Todas as isoformas da proteína p63 contêm um DBD e um OD com seqüências homólogas a p53. A Figura 1 demonstra em A as isoformas produzidas da proteína p63, e, em B, a identidade compartilhada de seus domínios funcionais com a proteína p53.

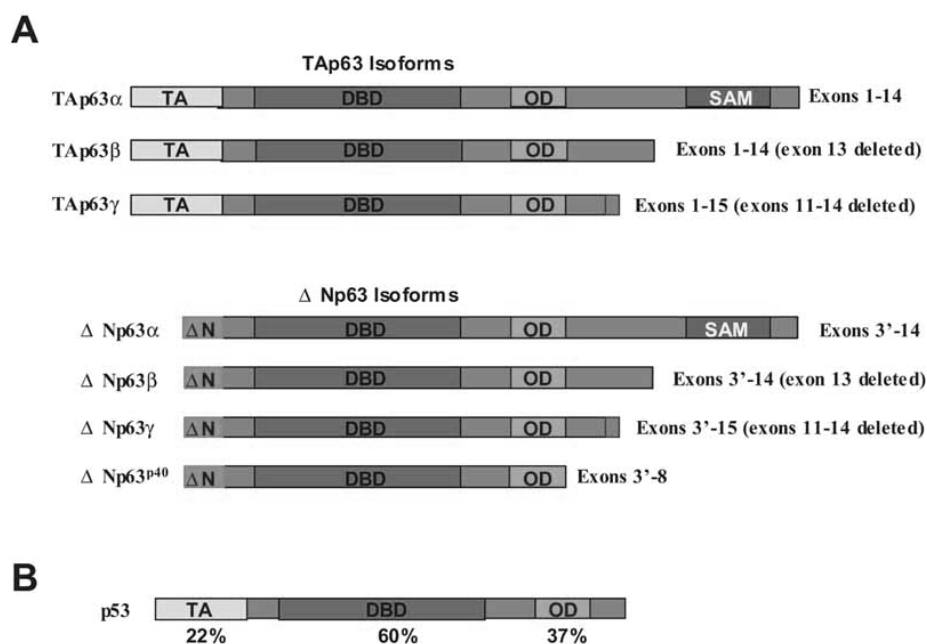


Figura 1 – Isoformas da proteína p63 (A) e porcentagem de homologia seqüencial de seus domínios funcionais com p53 (B).  
TA-Transactivation Domain, DBD-DNA Binding Domain, OD-Oligomerization Domain, SAM-sterile alpha motif. (KING; WEINBERG, 2007).

As isoformas protéicas do gene *p63* compartilham mais de 60% da identidade de seus aminoácidos com a proteína do p53. Assim como possuem também *hotspots* para mutações semelhantes aos do P53 em tumores (MOLL et al., 2001). De acordo com o produto final, a

proteína traduzida pode ser chamada de p40 ( $\Delta\text{Np63}^{\text{p40}}$ ), p51A (TAp63 $\gamma$ ), p51B (TAp63 $\alpha$ ) e p73L ou CUSP (proteína encontrada na estomatite ulcerativa crônica) (HIBI et al., 2000; RATOVITSKI et al., 2001).

Estas proteínas podem gerar uma complexidade de modulações por combinações de suas extremidades iniciais e terminais específicas. A compreensão de suas funções biológicas depende do conhecimento dos locais e das formas protéicas expressas sob determinadas circunstâncias. As proteínas TAp63 podem mimetizar a função de p53 *in vitro*, incluindo a transativação de muitos de seus genes-alvo, podendo induzir apoptose. Por outro lado, as proteínas  $\Delta\text{Np63}$  atuam como inibidoras destes genes-alvo, para o próprio p53 e também para suas próprias proteínas TAp63 (MOLL et al., 2001).

Com relação a interação das isoformas  $\Delta\text{Np63}$  com p53, existem evidências experimentais de que a proteína  $\Delta\text{Np63}$  possa ter uma afinidade mais forte com certos alvos específicos de promotores gênicos do que a proteína p53. Neste caso, a inibição desta última proteína ocorreria pela competição protéica da ligação aos seus alvos gênicos promotores (HIBI et al., 2000; RATOVITSKI et al., 2001. De acordo com Moll et al. (2001), um sistema de *feedback* poderia existir: enquanto a isoforma  $\Delta\text{Np63}$  pode atuar como um inibidor transcricional da proteína p53, esta última pode agir como um inibidor da estabilidade protéica de  $\Delta\text{Np63}$ .

Segundo Dohn et al. (2001), as isoformas TAp63 $\alpha$ , TAp63 $\beta$  e TAp63 $\gamma$  possuem a capacidade de ativar o gene p53 e, com isso, induzir apoptose e bloquear o ciclo celular. Entretanto, as outras três isoformas ( $\Delta\text{Np63}\alpha$ ,  $\Delta\text{Np63}\beta$  e  $\Delta\text{Np63}\gamma$ ) podem atuar como dominantes negativas à ação supressora tanto do p53 quanto das isoformas TAp63.

King et al. (2006) encontraram a habilidade da isoforma  $\Delta\text{Np63}\alpha$  para atuar como um regulador transcricional e bloquear o processo de diferenciação *in vitro* em queratinócitos,

mantendo uma população de células renováveis dentro da epiderme, porém, ressaltam a importância da espécie tecidual avaliada para uma adequada interpretação da função de *p63*.

A essencial contribuição do gene *p63* para o desenvolvimento embrionário é comprovada pelas anormalidades observadas em experimentos realizados em camundongos com a deleção deste gene (*knockout*), que incluem ausência ou graves má-formações craniofaciais e dos membros, assim como ausência de dentes e da epiderme com seus apêndices, todas estas estruturas dependentes de interações recíprocas epitélio-mesenquimais para o modelo morfogenético de desenvolvimento do mesoderma subjacente (YANG et al., 1998). Segundo King e Weinberg (2007), estes camundongos morrem em poucas horas após o nascimento, provavelmente devido a desidratação.

Segundo Yang et al. (1998), a epiderme embrionária de camundongos com mutações homozigóticas neste gene passa por um processo incomum de diferenciação não-regenerativa, culminando em ausência marcante de diferenciação do epitélio escamoso e seus anexos, incluindo glândulas sudoríparas, sebáceas, lacrimais, mamárias e salivares, germes dentais e folículos pilosos. Ao invés da epiderme normal, estes camundongos retêm placas isoladas de células epiteliais cuboidais desorganizadas ao longo da epiderme exposta. Em outros locais de epitélio escamoso, incluindo esôfago, vagina, porção proximal do estômago, cérvix uterino e até no epitélio de transição da bexiga, também foram encontradas anormalidades. De acordo com Pellegrini et al. (2001), estas descobertas mostram forte correlação entre a expressão do *p63* nas células progenitoras epiteliais e sua absoluta necessidade para o desenvolvimento normal do epitélio estratificado escamoso.

Segundo Yang et al. (1998), as falhas de desenvolvimento dos membros são devidas a deficiência na manutenção da crista ectodérmica apical, um epitélio estratificado especializado, essencial para este desenvolvimento. Já as anomalias craniofaciais devem-se a ausência ou expressão alterada do P63 nas superfícies ectodérmicas dos arcos branquiais,



importantes para a morfogênese direta do esqueleto e das estruturas de tecido mole craniofaciais.

De acordo com Moll et al. (2001), algumas mutações heterozigóticas deste gene em humanos estão relacionadas com desordens autossômicas dominantes, como a Síndrome da Displasia Ectodérmica, ou a rara desordem de desenvolvimento chamada de EEC (do inglês, *Ectrodactyly, Ectodermal dysplasia and Facial Clefts*), que consiste em Ectrodactilia, displasia ectodérmica e fendas faciais.

### **2.3.3. O gene *p63* na proliferação e diferenciação celular**

O gene *p63* tem sido relacionado a processos biológicos que contribuem para a homeostase epidérmica, incluindo adesão, proliferação, estratificação e diferenciação celular. Defeitos em quaisquer destes processos podem contribuir para um fenótipo neoplásico (KING; WEINBERG, 2007).

Células basais do epitélio humano normal expressam fortemente proteínas p63 – predominantemente o isotipo  $\Delta Np63^{p40}$  – que vão favorecer as necessidades de proliferação destas células em epitélios como os da pele, da próstata, da uretra, do cérvix uterino e da vagina (YANG et al., 1998), podendo também comandar habilidades regenerativas. Segundo Parsa et al. (1999), a expressão da proteína p63 pode ser considerada como marcadora de células de reserva (*stem cells*) em diversos tecidos epiteliais. Porém, de acordo com Pellegrini et al. (2001), estas células perdem esta expressão tão logo saem do compartimento das células-tronco progenitoras na camada basal do epitélio.

Segundo resultados de Noszczyk e Majewski (2001), as isoformas  $\Delta Np63$  também podem estar envolvidas no controle de processos fisiológicos de proliferação e migração relacionados à cicatrização que se segue após lesões cutâneas em humanos.

De acordo com Candi et al. (2006), ambas as isoformas TAp63 e  $\Delta$ Np63 são importantes para a morfogênese epitelial. No entanto, aumento da expressão das isoformas  $\Delta$ Np63 pode inibir as funções das isoformas TAp63. Enquanto a isoforma  $\Delta$ Np63 $\alpha$  está relacionada com a manutenção das células progenitoras epiteliais, sabe-se também que a diferenciação dos queratinócitos está associada ao desaparecimento da expressão desta isoforma, havendo assim uma liberação funcional da isoforma TAp63 $\alpha$  para regulação do processo de diferenciação epitelial.

A regulação da expressão das isoformas da proteína p63 na epiderme é um processo dinâmico. Na epiderme pós-natal *in vivo*, assim como em culturas primárias de queratinócitos, existe um predomínio da isoforma  $\Delta$ Np63 $\alpha$  até o início da indução do processo de diferenciação terminal, quando então ocorre uma elevação da expressão da isoforma TAp63 $\alpha$  (KING et al., 2006).

Segundo Yang et al. (1998), a proteína TAp63 $\alpha$  (p51B) está implicada no desenvolvimento (crescimento e diferenciação), sendo fraca em estudos de transativação e indução da apoptose, se comparada com a p53. Isto porque a extremidade terminal  $\alpha$ -C confere propriedades estruturais únicas que governam sua função. Por outro lado, a isoforma protéica TAp63 $\gamma$  (p51A), foi tão importante como a p53 em estudos de transativação de genes-alvo (ex: *p21*, *Bax*) e de indução da apoptose.

#### **2.3.4. Influência do gene *p63* nas neoplasias**

A isoforma  $\Delta$ Np63 $\alpha$  tem sido associada a modulação da expressão de diversos genes que podem influenciar o fenótipo celular tumoral. Barbieri et al. (2005) observaram que o gene indutor de apoptose *IGFBP3* pode ter a repressão de seu processo de transcrição pela isoforma  $\Delta$ Np63 $\alpha$ . Da mesma forma, segundo Wu et al. (2005), a supracitada isoforma pode aumentar a expressão da proteína de choque térmico HSP70 (HSP, do inglês *Heat Shock*

*Protein*). A proteína HSP70 é uma proteína antiapoptótica, cujo aumento de expressão está associado com a ocorrência de metástases, sendo encontrada uma correlação entre a expressão aumentada desta proteína e da isoforma  $\Delta Np63\alpha$  em carcinomas primários de cabeça e pescoço (WU et al., 2005).

No câncer humano, o *p63* tem uma rara tendência de inativação através de mutações (HAGIWARA et al., 1999). Algumas mutações no gene *p63* geralmente ocorrem entre os códons 151-170 e está associada à crise blástica na leucemia mielóide crônica (YAMAGUCHI et al., 2001). Por outro lado, nenhuma mutação neste gene foi encontrada em 47 carcinomas de bexiga estudados. No entanto, uma maior expressão de  $\Delta Np63$  foi encontrada em 30 de 47 destes tumores malignos. Sendo a expressão da isoforma TAp63 concomitantemente diminuída em 25 dos 47 tumores (PARK et al., 2000).

Na maioria das vezes, nos carcinomas epidermóides, o locus gênico de *p63* encontra-se amplificado, com um correspondente aumento em sua expressão, principalmente da isoforma  $\Delta Np63\alpha$ , assim como nas células basais do epitélio humano normal (HAGIWARA et al., 1999; HIBI et al., 2000).

De acordo com Parsa et al. (1999), a maioria das células pouco diferenciadas dos carcinomas epidermóides, assim como os queratinócitos indiferenciados progenitores normais, expressa a proteína p63.

A expressão da proteína p63 está mais associada a carcinomas epidermóides e de células transitórias do que a adenocarcinomas (DI COMO et al., 2002). Glickman et al. (2001) encontraram altos níveis de p63 em carcinomas epidermóides do esôfago, mas não em adenocarcinomas de cólon, reto ou esôfago, sugerindo que a expressão desta proteína possa contribuir para o processo de carcinogênese nos tumores epidermóides. Além disso, Hall et al. (2001) encontraram correlação entre a expressão da proteína p63 e mutação no gene P53 nas neoplasias avançadas e displasias de alto grau esofágicas.

Apesar da maioria das investigações na literatura sobre a expressão aumentada da proteína p63 em neoplasias não incluírem uma análise das isoformas específicas presentes, níveis elevados das isoformas  $\Delta Np63$  têm sido associados com carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, pele, pulmão e cérvix uterino (HIBI et al., 2000; LIN et al., 2006).

Em um estudo realizado por Crook et al. (2000), em 25 carcinomas nasofaríngeos primários avaliados, quase todas as células tumorais tiveram um aumento predominante na expressão de  $\Delta Np63$ , que normalmente no epitélio nasofaríngeo normal estaria limitado às células proliferativas das camadas basal e suprabasal.

Alguns carcinomas de células escamosas da cabeça e do pescoço e outros do pulmão mostraram aumento na expressão das isoformas  $\Delta Np63$  associado a uma amplificação de seu locus gênico. Os autores nomearam então este locus amplificado de AIS (Amplified In Squamous carcinoma). Contudo, o locus AIS pode também ser crítico para as células progenitoras na manutenção do contínuo desenvolvimento epitelial. O aumento de sua expressão leva a uma maior capacidade de renovação destas células, assim como a uma maior capacidade de crescimento neoplásico. A forma dominante negativa predominante nestes tumores é a isoforma também denominada de  $p40^{AIS}$  ( $\Delta Np63^{p40}$ ), que pode atuar como um oncogene (HIBI et al., 2000).

A associação entre as infecções virais e a expressão de p63 nas neoplasias ainda necessita ser melhor investigada. Wang et al. (2001) encontraram forte correlação entre a infecção por HPV-16 e a expressão da proteína p63 em carcinomas escamosos invasores do colo uterino. Além disso, verificou-se que o carcinoma de nasofaringe, que é a neoplasia mais fortemente associada ao vírus Epstein-Barr, também expressa difusamente a proteína p63 (CROOK et al., 2000).

### **2.3.5. Expressão da proteína p63 no carcinoma epidermóide oral**

Um dos fatores considerados de relevância prognóstica no CEO é a amplificação do cromossomo 3q21-29, onde o gene *p63* está localizado (THURFJELL et al., 2005). A detecção da proteína p63 por IHC no CEO é relatada por estudos prévios na literatura, suportando a idéia de seu envolvimento no processo da tumorigênese oral. No entanto, existem poucas pesquisas sobre o significado prognóstico da detecção da imunexpressão da proteína p63 no CEO (BORTOLUZZI et al., 2004; CHOI et al., 2002; FOSCHINI et al., 2004; GOTO et al., 2005; LO MUZIO et al., 2005; WEBER et al., 2002).

Segundo Thurfjell et al. (2005), a imunexpressão de p63 em carcinomas de cabeça e pescoço pode influenciar a diferenciação celular tumoral. Ao investigarem a relação da imunexpressão quantitativa da proteína p63 com as curvas de sobrevida, Choi et al. (2002) não encontraram nenhuma associação significativa, sendo o mesmo observado em relação a ocorrência de recidivas e metástases. Por outro lado, em um estudo com 94 casos de CEO, Lo Muzio et al. (2005) observaram que a elevada imunexpressão da proteína p63 estava associada a um fenótipo tumoral mais agressivo e a um prognóstico ruim.

A influência da imunexpressão da proteína p63 e de suas isoformas no CEO ainda necessita ser mais bem pesquisada. Existem poucos relatos sobre a influência das isoformas de p63 nos tumores epidermóides orais. Entre um dos poucos trabalhos existentes na literatura, Chen et al. (2004) encontraram associação entre níveis reduzidos de expressão das isoformas TAp63 e um prognóstico ruim no CEO.

### **2.4. O Papilomavírus Humano (HPV – *Human Papillomavirus*)**

O HPV foi o primeiro DNA vírus oncogênico a ser descoberto nos mamíferos, sendo que a primeira descrição foi atribuída a Shope e Hurst (1933). Eles observaram que a infecção

pelo HPV está associada ao desenvolvimento de lesões papilomatosas ceratinizadas semelhantes a chifres em coelhos selvagens do meio-oeste dos Estados Unidos, denominados de *Jackalopes*. Esses autores identificaram algumas lesões que progrediram para neoplasias epiteliais invasivas, originando então o primeiro modelo animal de câncer causado por um vírus em mamífero. Estas observações também foram confirmadas por Rous e Beard (1935), passando o vírus a ser denominado de *Cottontail Rabbit Papillomavirus* ou *Shope Papillomavirus*.

O HPV é um vírus da família *Papovaviridae*, gênero *papovavirus*, não envelopado, com cerca de 55nm de diâmetro. Possui um capsídeo protéico icosaédrico de 72 capsômeros, destituído de envelope lipoprotéico, que é formado por duas proteínas capsídicas: L1 e L2. O genoma do HPV é composto por uma única molécula de DNA circular de fita dupla que contém aproximadamente 8000 pares de base (pb) associadas com histonas (FAVRE, 1975). Todas as regiões codificadoras de proteínas (ORF, do inglês *Open Reading Frame*) estão restritas a uma única cadeia. O genoma é funcionalmente dividido em três regiões de diferentes tamanhos: uma região regulatória não codificadora de 400 a 1000 pb, denominada região longa de controle (LCR, do inglês *Long Control Region*), que compõe cerca de 10% do genoma. Essa região possui o promotor p97 que regula a replicação do DNA viral, controlando o processo de transcrição das ORFs (APT et al., 1996). A segunda região, engloba as ORFs E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7, que possuem os genes de transcrição precoce (E1 a E7: *early genes*) que codificam proteínas envolvidas na replicação viral e oncogênese, compreendendo cerca de 50% do genoma viral. A terceira região é onde se encontram os genes de transcrição tardia, L1 e L2 (L: *late genes*), que somente são expressos nas células epiteliais escamosas diferenciadas, codificam as proteínas estruturais do capsídeo viral e ocupam os 40% remanescentes do genoma do HPV (McKAIG et al., 1998). As características das regiões regulatórias do HPV estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características das regiões regulatórias (ORFs) do HPV\*.

<b>ORF</b>	<b>FUNÇÃO PRINCIPAL</b>
E7	Transformação celular, ligação com a proteína pRb e ativação da transcrição celular
E6	Transformação celular, ligação e degradação de p53
E5	Transformação celular através da interação com receptores do fator de crescimento
E4	Rompimento de citoqueratinas
E3	Função desconhecida
E2	Proteínas regulatórias da transcrição viral
E1	Síntese e replicação do DNA viral e manutenção do plasmídeo
L1	Proteína principal do capsídio
L2	Proteína secundária do capsídio

\*Adaptado de McKaig et al. (1998).

A infecção pelo HPV pode resultar primeiramente em verrugas auto-limitantes ou tumores epiteliais inicialmente benignos. Diversas pesquisas têm associado tipos específicos de HPV a lesões malignas e pré-malignas da vulva, pênis, conjuntiva e trato aerodigestivo (ZUR HAUSEN, 1987). No entanto, as evidências atualmente consideram o HPV como o principal causador do câncer de colo uterino (WALBOOMERS et al., 1999), estando o DNA deste vírus presente em mais de 80% dos tumores cervicais diagnosticados (BOSCH et al., 1995), além disso, sua infecção pode se apresentar de maneira transitória ou permanente (FRANCO et al., 1999).

O HPV infecta a camada basal do epitélio, podendo ser classificado conforme seu tropismo em dois tipos: cutâneo e mucoso. O HPV cutâneo é epiteliotrófico e infecta preferencialmente a pele das mãos e dos pés. O HPV mucoso é mucosotrópico e pode infectar geralmente as mucosas da orofaringe, laringe, trato respiratório, colo uterino e epitélio anogenital (MUNOZ et al., 2003).

De acordo com sua associação com o câncer cervical e suas lesões precursoras, os HPV's podem ser divididos em dois grupos: os de baixo ou alto risco oncogênico. Os HPV's de baixo risco incluem os subtipos HPV-6, 11, 42, 43 e 44, que são encontrados principalmente em lesões primárias e de baixo grau no colo uterino (MUNOZ et al., 2003). Entretanto, segundo Burd (2003), estes subtipos de HPV também podem ser encontrados, porém de forma menos freqüente, nos carcinomas cervicais.

Os subtipos virais de alto risco são: HPV-16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, e 70, podendo ser mais freqüentemente encontrados nas neoplasias malignas cervicais (MUNOZ et al., 2003). Em 1995, a Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC – *International Agency for Research on Cancer*) declarou oficialmente os subtipos HPV-16 e 18 como agentes carcinogênicos humanos (IARC, 1995).

#### **2.4.1 Mecanismos moleculares de transformação maligna do HPV**

O conhecimento da patogênese da infecção pelo HPV tem sido obtido através de estudos em amostras de colo uterino, e sabe-se que três situações podem ser possíveis após a infecção da mucosa pelo HPV: estado latente, estado subclínico ou doença crônica. O estado latente caracteriza-se pela detecção do DNA do HPV sem a lesão diagnosticável, o estado subclínico ocorre pela detecção das lesões apenas por métodos específicos, como por exemplo, a colposcopia, e o estado de doença clínica pode apresentar-se com diferentes graus de severidade e comprometimento orgânico, desde a formação de lesões papilomatosas até o câncer invasivo (SOUSA, 2001). Segundo Steinberg (1990), estas situações são dependentes do predomínio de uma infecção produtiva ou transformadora. A infecção produtiva pode ser diagnosticada por alterações morfológicas denominadas de coilocitose, ocorrendo quando a replicação viral resulta na formação de milhões de partículas virais em células do epitélio. Estas células podem sofrer esfoliação e infectar um novo hospedeiro. Na infecção



transformadora ocorre o predomínio da expressão dos genes da região E, que regulam a transcrição e oncogênese viral, não havendo a formação de partículas virais infectantes e o DNA viral integra-se ao genoma do hospedeiro, podendo interferir na homeostase do queratinócito e causar alterações morfológicas ou funcionais, desenvolvendo lesões precursoras do câncer ou um câncer invasivo.

Segundo Flores e Lambert (1997), o ciclo de replicação do HPV começa com a entrada viral pela camada basal do epitélio, na maioria das vezes através de pequenas lesões epiteliais. Uma vez no interior do núcleo, o DNA do HPV se replica juntamente com a proliferação e diferenciação celular, progredindo até a superfície epitelial. Na camada basal, a replicação viral é considerada não produtiva e o vírus permanece em sua forma episomal com um baixo número de cópias, utilizando a maquinaria de replicação do DNA do hospedeiro para ajudar a sintetizar o seu próprio DNA (FLORES; LAMBERT, 1997). Nos queratinócitos diferenciados da camada suprabasal do epitélio, o vírus replica seu DNA em alto número de cópias e sintetiza suas proteínas do capsídio (FLORES et al., 1999).

De acordo com Ha e Califano (2004), a progressão da fase de incubação para a de expressão ativa depende de três fatores: permissividade celular, subtipo de viral e estado imunológico do hospedeiro.

Os diferentes comportamentos da infecção pelo HPV são relacionados à transcrição de oncogenes virais. Normalmente, a transcrição de E1 e E2 causa repressão de E6 e E7, o que permite a função de supressão tumoral das proteínas p53 e pRb, com a homeostase tecidual normal. Quando o genoma viral integra-se ao do hospedeiro, pode ocorrer a quebra e perda de função dos genes E1 e E2, começando o processo de transcrição dos genes E6 e E7, cujos produtos podem se ligar inativando as respectivas proteínas supressoras tumorais p53 e pRb, interferindo desta maneira no controle do ciclo celular, na apoptose e na manutenção da estabilidade cromossômica (WENTZENSEN et al., 2004). Por outro lado, as mutações nas

proteínas p53 e pRb são raramente detectadas em linhagens celulares de carcinomas cervicais HPV positivos.

Segundo Farthing et al. (1994), a associação das proteínas oncogênicas virais com as supressoras tumorais possui uma afinidade cerca de dez vezes maior nos HPVs de alto risco. Syrjanen e Syrjanen (1999) observaram que, nos HPVs de baixo risco oncogênico, a proteína E6 não se liga à p53 e não afeta sua estabilidade *in vitro*, além disso, a proteína E7 se liga ao pRb com menor afinidade.

O gene E6 é conservado nos tumores onde a sua proteína é continuamente expressa, sendo esta uma potente oncoproteína dos HPVs de alto risco (McKAIG et al., 1998). Segundo Mantovani e Banks (2001), a proteína E6 pode interagir com a p53, levando a degradação desta última, permitindo o acúmulo de mutações, junto com a imortalização e a transformação da célula. De acordo com McKaig et al. (1998), a proteína E6 pode também induzir a imortalização celular através da ativação da telomerase.

O genoma episomal do HPV é geralmente encontrado nas lesões de baixo grau. Já nas lesões de alto grau, todo o genoma viral ou fragmentos dele encontram-se integrados ao DNA do hospedeiro, o que pode acarretar alterações na expressão dos oncogenes virais, propiciando a progressão maligna (FERBER et al., 2003). De acordo com Das et al. (1992), a integração do DNA do HPV-16 ao genoma celular ocorre em cerca de 70% das neoplasias cervicais malignas. Por outro lado, esta integração é menos observada em lesões como as displasias severas ou o carcinoma *in situ*.

Apesar da ocorrência freqüente no carcinoma cervical, alguns pesquisadores consideram que raramente o HPV está integrado ao genoma do hospedeiro no CEO. Por outro lado, outros estudos sugerem que a integração do HPV está mesmo associada com o processo carcinogênico da mucosa oral (MILLER; WHITE, 1996).

A infecção pelo HPV demonstra predileção pelos carcinomas tonsilares, onde a positividade encontrada (50-60%) é maior que nos tumores de outras localizações anatômicas (6-10%) (HARAF et al., 1996). Além disso, a integração ao genoma hospedeiro e a transcrição de oncogenes virais têm sido mais observadas nestes tumores (SNIJDERS et al., 1992; WILCZYNSKI et al., 1998). No entanto, Steenbergen et al. (1995) demonstraram a integração genômica do HPV-16 em uma amostra de CEO e em sua respectiva linhagem celular derivativa, demonstrando um processo ativo de transcrição também nestes casos.

#### **2.4.2 Detecção do HPV na cavidade oral**

As infecções pelo HPV são disseminadas e ocorrem em todo o mundo. Os HPVs infectam a pele e as mucosas, podendo induzir a formação de neoplasias epiteliais benignas e malignas (HA; CALIFANO, 2004).

Os HPVs de alto risco mais frequentemente encontrados no CEO são os subtipos 16 e 18, assim como também no câncer anogenital (CHANG et al., 1990; SCULLY, 2005). Devido a natureza epiteliotrópica do HPV, assim como as similaridades morfológicas entre as mucosas anogenital e oral, diversas investigações sobre a influência do HPV no CEO começaram a ser realizadas (SYRJANEN, 2003). De acordo com zur Hausen (1996), os HPVs 16 e 18 são os subtipos presentes em cerca de 95% dos CEOs.

Syrjanen et al. (1983), ao descreverem alterações citopáticas do HPV em carcinomas orais idênticas àquelas encontradas em carcinomas cervicais, foram os primeiros a sugerir o envolvimento do HPV no desenvolvimento do CEO.

Os métodos de coleta para investigação da mucosa oral normal menos invasivos e mais utilizados atualmente são os esfregaços (*swabs*) ou os bochechos com soluções específicas. No entanto estes métodos ainda não estão padronizados, e as estimativas de prevalência permanecem inconsistentes (McKAIG et al., 1998). Por este motivo, a ocorrência

do HPV na mucosa oral normal é observada em grande variação, com taxas de detecção entre 22 a 60% (SMITH et al., 1998).

Uma das primeiras investigações sobre a presença do DNA do HPV na mucosa oral normal através da PCR foi conduzida por Maitland et al. (1987), que avaliaram pacientes sem história clínica de infecção oral ou cervical pelo HPV e encontraram 42% (5/12) das amostras biopsiadas com positividade. Em outro estudo conduzido em voluntários sadios, mas com amostras obtidas através de esfregaços orais para investigação da presença do HPV-16 pela PCR, Jalal et al. (1992) encontraram uma prevalência de infecção de 43% (13/30) na mucosa oral aparentemente normal dos pacientes avaliados.

Em uma investigação realizada com recém nascidos na Índia, o DNA do HPV foi encontrado em células da mucosa oral de 41,6% dos filhos de mães com esfregaços cervicais positivo para o HPV (CHATTERJEE et al., 1998; SUMMERSGILL et al., 2001). Nos Estados Unidos, o HPV foi identificado na cavidade oral de cerca de 6% das crianças e adolescentes sadios, num estudo em que foram selecionados participantes com idade menor ou igual a 20 anos.

Ao investigar pela PCR a presença do HPV em 37 pacientes adultos por meio da obtenção de amostras de esfregaço de mucosa oral normal, Terai et al. (1999) encontraram uma alta prevalência com 30 (81,1%) dos pacientes infectados, sendo 26 (86,7%) das 30 amostras positivas para o subtipo HPV-18 e a infecção com mais de um subtipo viral identificada em 17 (56,7%) casos.

Foi sugerido que a prevalência do HPV na mucosa oral normal poderia consistir em infecções subclínicas e/ou latentes, e que a infecção com um baixo número de cópias do vírus é comum na cavidade oral (TERAI et al., 1999). Além disso, Zhang et al. (2004) sugeriram que a mucosa oral poderia atuar como um reservatório para novas infecções pelo HPV e/ou como uma potencial fonte nos casos de recorrência desta infecção.

Os diversos subtipos de HPV também têm sido encontrados por vários autores em lesões orais benignas, como papiloma, condiloma, verruga vulgar, hiperplasia epitelial focal e na epidermodisplasia verruciforme (BERKHOUT et al., 1995; CHANG et al., 1991; PADAYACHEE, 1994; SUSKIND et al., 1996).

A probabilidade de detecção do HPV em lesões pré-cancerosas da mucosa oral é duas a três vezes maior que na mucosa oral normal, sendo que esta probabilidade aumenta para 4,7 vezes ao comparar-se o CEO e a mucosa oral normal. Além disso, os HPVs de alto risco aparecem 2,8 mais vezes no CEO que os subtipos de baixo risco (MILLER; JOHNSTONE, 2001).

A influência dos HPVs de alto risco como agente etiológico para a carcinogênese oral tem sido estudada e relacionada a um subgrupo de neoplasias, mas as evidências de seu papel no desenvolvimento e progressão do CEO ainda têm sido controversas, podendo haver considerável variabilidade das taxas de infecção conforme fatores como população estudada, localização tumoral, qualidade das amostras estudadas e recursos técnicos utilizados para a detecção do HPV (DAHLGREN et al., 2004; GILLISON et al., 2000; McKAIG et al., 1998; MORK et al., 2001).

Evidências de diversos laboratórios demonstraram que os HPVs de alto risco podem estar envolvidos na etiologia do CEO. As investigações encontraram que queratinócitos da mucosa oral podem ser transformados e imortalizados *in vitro* por HPVs de alto risco através de mecanismos que envolvem suas oncoproteínas E6 e E7 (PARK et al., 1991; SCHEFFNER et al., 1993). Além disso, em alguns casos, a presença de HPV identificada no CEO primário permaneceu também em suas respectivas metástases linfonodais (HOWELL; GALLANT, 1992; WOODS et al., 1993).

Poucos anos mais tarde, o DNA do HPV foi detectado em diversos estudos utilizando variadas técnicas de identificação viral como a reação em cadeia da polimerase (PCR, do

inglês *Polymerase Chain Reaction*), *southern blot* e hibridização *in situ* em diferentes espécies de amostras tissulares tumorais, assim como também em amostras sorológicas dos pacientes com CEO (CAPONE et al., 2000; GILLISON et al., 2000), confirmando desta forma as evidências prévias.

As técnicas para detecção do HPV possuem diferentes sensibilidades. Segundo Zhang et al. (2004), a menor sensibilidade é atribuída às técnicas de imunofluorescência, IHQ e hibridização *in situ*; as técnicas *southern blot* e *dot blot* são consideradas de moderada sensibilidade e a PCR é classificada como o método mais sensível para a identificação do HPV.

No maior estudo de meta-análise realizado até o presente momento sobre o assunto, desenvolvido por Miller e Johnstone (2001), foi confirmada a maior detecção do HPV em amostras de CEO em comparação com a mucosa oral normal, com 46,5% e 10% de casos infectados, respectivamente. Além disso, os HPVs de alto risco foram os mais encontrados em associação com o tumor e os resultados indicaram o HPV como um fator de risco independente para o CEO.

Herrero et al. (2003), através de um estudo multicêntrico da IARC conduzido em nove países, que investigou a presença do HPV em carcinoma oral e de orofaringe em pacientes e indivíduos controles saudáveis, observaram maior frequência do HPV-16 na cavidade oral e na orofaringe entre os pacientes com mais de um parceiro sexual e/ou que praticavam sexo oral, enquanto a menor frequência foi encontrada entre os pacientes tabagistas.

No primeiro estudo publicado com amostra populacional brasileira, Miguel et al. (1998) investigaram através da PCR a presença do HPV em 45 pacientes acometidos por carcinomas orais ou de orofaringe, com amostras tumorais provenientes de biópsias que foram armazenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  e posteriormente processadas. O DNA do HPV foi encontrado apenas

em cinco (12,8%) das 39 amostras de tumores localizados em orofaringe (três em tonsilas, um em base de língua e um no seio piriforme) e em nenhuma das 16 amostras de CEO estudadas.

#### **2.4.3. Transmissão do HPV para a mucosa oral**

Estudos epidemiológicos sobre o câncer cervical demonstraram claramente que a transmissão dos HPVs de alto risco mucosotrópicos ocorre pelo contato sexual (GILLISON et al., 2000; IARC, 1995), sendo que a prevalência desta infecção é maior entre as idades de 15 a 40 anos, predominantemente entre os indivíduos com múltiplos parceiros sexuais (BOSCH et al., 1995).

No trato aerodigestivo superior, ainda não estão completamente elucidados os métodos pelos quais o HPV é transmitido. Entre as hipóteses propostas estão a transmissão sexual, a infecção perinatal e a auto-infecção (McKAIG et al., 1998).

Embora a presença do HPV nos carcinomas de cabeça e pescoço ainda não tenha sido convincentemente ligada a práticas sexuais específicas como o sexo oral, um maior índice de positividade para esta infecção viral foi associado ao número de parceiros sexuais em três estudos com casos-controle (MADEN et al., 1992; SCHWARTZ et al., 1998; SMITH et al., 1998). Segundo Herrero et al. (2003), a presença de mais de um parceiro sexual e a prática de sexo oral aumentam as chances de infecção pelo HPV e sua recorrência na cavidade oral. Outro fator que pode contribuir para o aumento da prevalência do HPV na cavidade oral, de acordo com Bishop et al. (1998), é a queda da defesa imunológica do paciente.

As lesões da papilomatose respiratória recorrente em laringe de recém nascidos estão associadas com a transmissão perinatal do HPV (SMITH et al., 1995). No entanto, conforme demonstrado por Watts et al. (1998) em um estudo prospectivo, a transmissão perinatal do HPV para a cavidade oral da criança através de mães infectadas pode ser considerada um evento raro. Koch et al. (1997) observaram também um baixo índice de detecção do HPV na

mucosa oral de crianças dinamarquesas ainda não iniciadas sexualmente, encontrando apenas uma amostra positiva em 392 amostras orais perscrutadas. Segundo os autores, a principal via de transmissão do HPV seria a sexual, justificando a ocorrência da infecção nas fases mais tardias da vida.

#### **2.4.4 Detecção do HPV por PCR em amostras parafinizadas de carcinoma epidermóide oral**

A infecção por HPV no CEO tem sido investigada em diferentes populações, havendo considerável diferença entre os estudos. O índice de positividade dos estudos que utilizaram amostras parafinizadas de CEO para a detecção do HPV através da PCR varia de 0 a 100%.

Kiyabu et al. (1989) foram um dos primeiros a investigarem a presença do HPV no CEO por PCR em amostras fixadas em formol e embebidas em parafina. ...

Chang et al. (1990) encontraram 11 (27,5%) dos 40 pacientes avaliados com positividade para o DNA do HPV em seus tumores, sendo identificado o subtipo HPV-16 em dez casos e o HPV-18 em apenas uma amostra.

Holladay e Gerald (1993) investigaram 39 casos de CEO e encontraram sete (17,9%) casos com positividade para o HPV, todos eles positivos para o subtipo HPV-16, sendo dois casos também infectados pelo HPV-11 e apenas um outro com o subtipo HPV-18.

O estudo de Woods et al. (1993) encontrou 14 (78%) dos 18 CEOs primários com o HPV. Além disso, a infecção com o mesmo subtipo de HPV esteve presente nos cinco casos de metástases cervicais investigados em relação aos seus respectivos tumores primários. A subtipagem viral específica revelou o HPV-16 e o HPV-18 presentes em duas amostras cada, e em cinco amostras houve a presença de ambos.

Brandwein et al. (1994) encontraram o DNA do HPV em 16 (25%) dos 64 tumores analisados, sendo 86% dos pacientes do gênero masculino. Entretanto, os autores não



observaram diferenças significativas para os tumores com positividade viral em relação ao gênero, idade, hábito de fumar, sobrevida livre da doença (SLD), diferenciação e estadiamento tumoral, concluindo que o HPV estaria associado a uma minoria de casos de CEO, além de não influenciar no prognóstico dos pacientes.

O predomínio dos tumores com a presença do HPV no gênero masculino também foi demonstrado por Zhang et al. (2004), que encontrou alta positividade de infecção pelo HPV (54/73 – 74%) nos casos de CEO estudados.

Em um estudo realizado na Espanha, Gonzalez-Moles et al. (1996) analisaram amostras de CEO em 37 pacientes para a investigação da presença do HPV-18, encontrando sete (19,1%) pacientes com amostras positivas.

Wen et al. (1997) investigaram no nordeste da China 45 pacientes com CEO, encontrando 14 (31,1%) de amostras com HPV, sendo mais prevalente a infecção pelo subtipo 18 em relação ao 16 (24,4% e 20%, respectivamente) e em 6 (13,3%) pacientes foram encontrados ambos os subtipos.

Em outra investigação, realizada na Índia, Balaram et al. (1995) encontraram alta positividade (75%) e multiplicidade de infecções pelos subtipos de HPV. No entanto, a maior taxa de infecção viral foi encontrada por Uobe et al. (2001), que encontraram 100% de amostras de CEO com HPV em um estudo realizado com 10 pacientes japoneses e 10 chineses.

Correnti et al. (2004) relataram 50% (oito em 16) de positividade para o HPV em um estudo conduzido na Venezuela, realizado através da PCR com amostras parafinizadas de CEO. Além disso, os autores também observaram um predomínio significativo da infecção no gênero feminino.

As investigações realizadas em pacientes africanos descartaram a influência etiológica do HPV no CEO para a região. Van Rensburg et al. (1996) encontraram apenas dois casos

(1,3%) com positividade viral – HPV-11 e 16 – em uma amostra de 146 tumores parafinizados. Em outro estudo mais recente, Boy et al. (2006) detectaram o DNA do HPV-18 em 11,9% (7/59) das amostras de CEO parafinizadas e, com base na investigação interior, concluíram não haver contribuição do HPV para a patogênese do CEO.

Em um estudo mais recente realizado com uma amostra de pacientes da população brasileira, Rivero e Nunes (2006) encontraram ausência total do DNA do HPV ao investigarem 40 pacientes com CEO, sendo 23 amostras de tumores parafinizados e as outras 17 provenientes de tumores frescos.

A presença do HPV nas lesões do CEO, confirmada por diversas investigações, tem conduzido a diferentes opiniões em relação ao assunto. Remmerbach et al. (2004) postularam que a cavidade oral poderia atuar como um possível reservatório viral. Outra teoria defende a presença ocasional do HPV no CEO, muitas vezes sobrestimada em consequência de contaminações amostrais (KANSKY et al., 2003). Por outro lado, Ha e Califano (2004) defendem o possível caráter transicional da infecção, como pode ocorrer nos carcinomas cervicais com o desaparecimento do DNA do HPV após o desenvolvimento tumoral (EVANDER et al., 1995), indicando efeitos oncogênicos virais iniciais que poderiam levar à carcinogênese oral.

O Brasil está entre os países com os maiores índices de carcinoma epidermóide oral (CEO). O gene *p63* é um análogo do gene supressor tumoral *p53* e a influência da expressão de ambos no prognóstico do CEO ainda necessitam ser mais bem investigada. O envolvimento do papilomavírus humano (HPV) no CEO é outro fator ainda não elucidado.

### 3. OBJETIVOS

1. Realizar um estudo retrospectivo para avaliar o perfil clinicopatológico e os fatores de risco dos pacientes diagnosticados com CEO no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), verificando também alguns parâmetros de sobrevida e comparando com a literatura atual existente para definir fatores implicados no prognóstico da doença.
2. Investigar o padrão da imunexpressão das proteínas p53 e p63 em amostras parafinizadas de tumores primários de CEO, sua associação com parâmetros clinicopatológicos e com os índices de sobrevida dos pacientes.
3. Verificar as alterações nos padrões de imunexpressão das proteínas p53 e p63 em espécimes parafinizados de CEO, através de amostras pareadas de tumores primários com suas respectivas metástases linfonodais cervicais.
4. Avaliar a influência das alterações nos padrões de imunexpressão das proteínas p53 e p63 na ocorrência de metástases linfonodais e nas curvas de sobrevida dos pacientes com CEO.
5. Por meio da PCR com *primers* gerais e para subtipos virais específicos, investigar a presença do HPV nas amostras tumorais parafinizadas dos pacientes estudados.
6. Nos pacientes com tumores HPV positivos, verificar o perfil clinicopatológico e a associação entre as curvas de sobrevida dos pacientes com a presença do DNA do HPV em tumores primários e suas correspondentes amostras pareadas de recidivas, metástases linfonodais e necropsias.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Aspectos éticos**

O projeto de pesquisa deste trabalho, sob o nº. 7327/2004, foi integralmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP/USP (Anexo A).

### **4.2. Casuística**

Os dados do trabalho foram obtidos analisando-se os prontuários do Serviço de Arquivo Médico (SAME) do HC-FMRP/USP. Foram selecionados inicialmente todos os casos de câncer de cabeça e pescoço ocorridos no HC-FMRP/USP, entre os anos de 1982 a 2002. A partir de uma criteriosa investigação em todos os prontuários médicos e laudos anátomo-patológicos, foram então selecionados 424 pacientes que tiveram o diagnóstico de CEO confirmado por biópsia.

Como critérios para inclusão no estudo, os pacientes selecionados deveriam ser desprovidos de: lesões multicêntricas, metástases iniciais em linfonodos cervicais ou à distância e antecedentes de câncer de cabeça e pescoço ou qualquer tratamento oncológico prévio.

Na avaliação dos prontuários médicos dos pacientes, foram obtidas informações sobre história pregressa da lesão, idade, gênero, localização tumoral primária, consumo de tabaco e bebidas alcoólicas, exposição actínica, traumatismo por prótese, classificação histológica, recidivas, metástases, óbitos, SLD e sobrevida global (SG). Todas as informações clinico-patológicas dos 424 pacientes deste estudo encontram-se na Tabela 2.

### 4.3. Critérios e definições

Para os propósitos de nosso estudo, o consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas foi analisado de maneira dicotômica nos pacientes, classificando-os como consumidores ou não (CARVALHO et al., 2004). Segundo estes critérios, o consumo de 4 cigarros de palha, 4 cachimbos cheio de tabaco ou 4 charutos é considerado equivalente a um maço de cigarros industrializados. De acordo com Lindhe (2005), foram considerados não-fumantes os indivíduos que nunca haviam fumado e os que haviam deixado de fumar pelo menos cinco anos antes. Para o consumo de bebidas alcoólicas foi considerado positivo quando relatado o uso diário de no mínimo 2 cervejas, 1 dose destilada, 2 taças de vinho, ou então, o hábito repetitivo de consumo de mais de 5 doses por vez, mesmo que ocasional (CARVALHO et al., 2004).

Os pacientes classificados como expostos à radiação actínica foram aqueles que relataram atividade de trabalho com exposição solar diária desprotegida.

A padronização da idade para caracterização da população do estudo foi realizada conforme critérios da OMS, que indica a idade de 60 anos como início da terceira idade nos países em desenvolvimento (SARINI et al., 2001).

De acordo com critérios da União Internacional Contra o Câncer (UICC), entre os tumores de cabeça e pescoço, os tumores da mucosa labial e da cavidade oral são classificados dentro do mesmo grupo de localização anatômica (SOBIN; WITTEKIND, 2002), integrando na CID da OMS o grupo correspondente aos seguintes códigos: C00 – Neoplasia maligna do lábio, C02 – Neoplasia maligna dos dois terços anteriores da língua, C03 – Neoplasia maligna da gengiva, C04 – Neoplasia maligna do assoalho da boca, C05 – Neoplasia maligna do palato duro, C06 – Neoplasia maligna de outras partes e de partes não especificadas da boca e C06-2 – Neoplasia maligna da área retromolar (CID-10, 1997). Conforme estes critérios, as seguintes localizações anatômicas com a lesão foram incluídas

em nosso estudo: lábio superior e inferior externo (borda do vermelhão), comissuras, mucosa do lábio superior e inferior, mucosa oral, mucosa da bochecha (mucosa jugal), trígono retromolar, sulcos buco-alveolares superior e inferior (vestíbulo da boca), gengiva, rebordo alveolar superior e inferior, palato duro, dois terços anteriores da língua (superfície dorsal, ventral e bordas lateral anterior às papilas valadas) e assoalho da boca. Foram excluídas as lesões encontradas em orofaringe, que inclui palato mole, base da língua, região tonsilar, úvula e faringe posterior.

Para a avaliação clínica dos pacientes com a doença, foi utilizado o sistema TNM, padronizado pela UICC e pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (SOBIN; WITTEKIND, 2002). Para as informações relativas ao tamanho do tumor primário (T), utilizamos os critérios preconizados, onde: Tis = Carcinoma *in situ*, T1 = Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão, T2 = Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão, T3 = Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão e T4 = Tumor que invade estruturas adjacentes. No entanto, para N e M, conforme informação disponível nos prontuários, tivemos a possibilidade de classificar os pacientes segundo a presença ou ausência de metástases em linfonodos regionais ou à distância.

Para a classificação histológica tumoral, foi utilizado o critério da OMS (SHANMUGARATNAM, 1991), no qual os tumores são classificados como bem, moderadamente ou pobremente diferenciados conforme o grau de diferenciação histológica.

A recidiva local da neoplasia foi definida como a ocorrência de outro carcinoma na mesma localização anatômica, com no máximo 2 cm de distância do tumor primário removido cirurgicamente (BRAAKHUIS et al., 2002; DE AGUIAR et al., 2007).

Independente dos resultados já descritos nos laudos anátomo-patológicos contidos nos prontuários dos pacientes, todas as lâminas foram reavaliadas pelo orientador e pelo pós-graduando.

#### **4.4. Estudo da sobrevida**

Do total de pacientes estudados, foram selecionados para o estudo de sobrevida 126 pacientes com CEO. Como requisitos, além dos critérios anteriormente citados, estes pacientes deveriam possuir em seus prontuários informações suficientes relativas a pelo menos seis meses de sobrevida, e foram também excluídos os pacientes com tumor de tamanho T4. A SLD foi estimada como o tempo decorrido entre a ressecção tumoral e a recorrência da doença como novo tumor primário ou metástase. A SG foi calculada a partir do início do tratamento até o último seguimento ou óbito do paciente. As curvas de sobrevivência foram estimadas utilizando-se o método de Kaplan e Meier (1958). As informações clinico-patológicas dos pacientes selecionados para esta avaliação específica encontram-se na Tabela 6.

#### **4.5. Estudo imunohistoquímico**

Da casuística total encontrada, foram selecionadas amostras de 106 pacientes para realização da investigação imunohistoquímica, entre os anos de 1990 e 2002, que possuíam blocos de parafina disponíveis para o estudo no arquivo do Departamento de Patologia do HC-FMRP/USP. Além disso, para avaliação da sobrevida conforme a imunoexpressão dos marcadores, a seleção dos pacientes seguiu os mesmos requisitos utilizados para o Estudo da Sobrevida, descrito previamente. As seguintes informações foram avaliadas: idade, gênero, localização tumoral primária, recidivas, metástases, classificação histológica, SLD e SG. As informações clinico-patológicas dos pacientes selecionados para esta avaliação específica encontram-se na Tabela 7.

A seleção foi feita através da análise das lâminas arquivadas coradas pela hematoxilina e eosina. Nos casos em que o paciente foi submetido a mais de um procedimento diagnóstico, foi considerada apenas a biópsia mais representativa da lesão em estudo.

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes histológicos seriados de 4 µm de espessura (micrótomo Spencer, modelo 820, série nº 17.797), que foram colocados em lâminas de vidro silanizadas a 8%. Esses fragmentos foram submetidos à técnica imunohistoquímica segundo o método da estreptavidina-biotina-peroxidase, utilizando-se o Kit Universal da Novocastra<sup>®</sup> (Novostain Super ABC Kit, Universal, Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK), segundo protocolo desenvolvido pelo Laboratório de Proliferação Celular do Departamento de Patologia da FMRP/USP (Anexo B). Após a reação, as lâminas foram cobertas por lamínula, com auxílio de Permaunt<sup>®</sup> (Fischer Scientific Company, Fair Lawn, NJ, USA).

Foram utilizados os seguintes anticorpos primários, nas seguintes diluições: p53 (Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK, clone DO7, 1:100) e p63 (Santa Cruz Biotechnology, Palo Alto, USA, clone 4A4, 1:100).

Para revelação das reações foi utilizado o diamino-benzidina (DAB) (Anexo C).

Em todas as marcações estudadas, foram utilizados controles externos positivos e negativos. Para a proteína p53, foram utilizados como controle carcinomas mamários (ductal invasivo) sabidamente positivos para esses marcadores. Para a proteína p63, foram utilizados como controle fragmentos de pele normal. Os controles negativos foram preparados pela omissão do anticorpo primário.

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz convencional. Foram examinados todos os campos em pequeno aumento (4X) que continham tumor, sendo consideradas células positivas aquelas coradas de marrom após as reações. As células foram contadas nas áreas



(campos) em pequeno aumento que exibiam maior concentração de células positivas, com o auxílio de uma ocular integradora em grande aumento (40X).

Para análise da imunexpressão da proteína p53, foram considerados casos positivos aqueles com 10% ou mais de células marcadas. Segundo Hasebe et al. (1994), para avaliação da imunexpressão desta proteína, o limite de 10% pode ser indicado para separação de bom e mau prognóstico, e este valor tem sido utilizado pela maioria dos trabalhos desta área (CHOI et al., 2002; CARLOS DE VICENTE et al., 2004; GRABENBAUER et al., 2000; KROPVELD et al., 1996; ZIGEUNER et al., 2004). Para a proteína p63, foi realizada uma análise semi-quantitativa em que foram avaliadas a quantidade e a intensidade do seu padrão de imunexpressão, conforme o escore de marcação descrito, para a avaliação quantitativa: 0 = ausência de marcação; 1 = 1 a 25% de células positivas; 2 = 26 a 50% de células positivas; 3 = 51 a 75% de células positivas e 4 = mais que 75% de células positivas; para a avaliação da intensidade: 0 = ausência de marcação; + = fraca; ++ = moderada; +++ = forte (MASSION et al., 2003; WEBER et al., 2002). Apenas a marcação nuclear foi considerada para estes marcadores.

#### **4.6. Estudo imunohistoquímico com amostras pareadas**

Para a investigação imunohistoquímica com amostras pareadas, foram selecionados do total da casuística 45 pacientes que tiveram metástase cervical e foram submetidos ao esvaziamento cervical, entre os anos de 1990 e 2002. A seleção dos pacientes para esta avaliação seguiu os mesmos requisitos utilizados para o estudo da sobrevida e para o estudo imunohistoquímico, descritos previamente. Foram então selecionadas duas amostras por paciente, a área tumoral mais representativa da biópsia do tumor primário (TP) e sua correspondente metástase linfonodal (ML), escolhendo também o linfonodo metastático mais representativo, no caso de haver mais de um. Nos prontuários médicos dos pacientes, as

seguintes informações foram avaliadas: idade, gênero, localização tumoral primária, metástases, óbitos, classificação histológica, SLD e SG. As informações clinico-patológicas dos pacientes selecionados para este estudo específico encontram-se na Tabela 12.

Assim como descrito previamente, foi utilizado o mesmo método de processamento histológico, a mesma técnica de reação imunohistoquímica, os mesmos anticorpos primários (p53 e p63, nas mesmas diluições), os mesmo controles externos positivos e negativos e o mesmo tipo de análise das lâminas.

Para ambos marcadores imunohistoquímicos (p53 e p63), foram considerados como casos positivos aqueles com 10% ou mais de células marcadas (HASEBE et al., 1994). Neste estudo específico, o mesmo valor de *cut-off* para p53 também foi escolhido para p63, com o intuito de evitar-se uma excessiva estratificação na classificação durante a comparação da imunopressão de p63 nas amostras pareadas.

O padrão de imunopressão do TP foi comparado com aquele em sua ML correspondente para os 45 pacientes selecionados. As amostras pareadas foram então classificadas como concordantes (quando TP e ML eram ambos positivos ou negativos) ou discordantes (quando uma amostra era positiva e a outra negativa).

#### **4.7. Detecção do HPV no carcinoma epidermóide oral**

As reações para detecção do DNA do HPV, que envolveu o processo de extração do DNA, amplificação e leitura dos resultados da PCR, foi executado no Laboratório de Genética Bioquímica do Departamento de Genética da FMRP/USP.

Os critérios de inclusão e exclusão utilizados para os pacientes deste estudo específico seguiram os mesmos requisitos utilizados para o Estudo da Sobrevida e para o Estudo Imunohistoquímico, descritos previamente. Da casuística total do trabalho, foram selecionados 87 pacientes enquadrados nos critérios de seleção, entre os anos de 1990 e 2002,

sendo investigadas para cada paciente duas amostras (TP e amostra pareada [AP]), correspondendo a 87 amostras de TP e 87 amostras de AP. As AP consistiram em recidivas tumorais, metástases em linfonodos ou casos de necrópsias, totalizando para a casuística final desta investigação específica o total de 174 amostras estudadas. Os casos de recidivas tumorais selecionados tiveram sua ocorrência na mesma localização anatômica do TP. A escolha da AP em linfonodo metastático foi realizada conforme descrição prévia, nos critérios do Estudo Imunohistoquímico com Amostras Pareadas. Os casos em que foram escolhidas necrópsias como AP consistiram de tumores irressecáveis, sem ocorrência de metástases. Os dados dos prontuários médicos relativos aos pacientes selecionados foram: idade, gênero, localização tumoral primária, consumo de tabaco, recidivas, metástases, classificação histológica, SLD e SG. As informações clinico-patológicas dos 87 pacientes selecionados para esta avaliação específica encontram-se na Tabela 15.

#### **4.7.1. Extração do DNA em amostras parafinizadas**

Foram realizados dois cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura em cada amostra, que posteriormente foram colocados em um tubo plástico estéril de 1,5 ml.

O DNA foi isolado e purificado dos cortes de tecidos embebidos em parafina com a utilização do kit MagneSil<sup>®</sup> Genomic, Fixed Tissue System (Promega Corporation, Madison, WI, USA), conforme protocolo descrito no Anexo D. Após o procedimento, as amostras de DNA foram estocadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.7.2. Reação em cadeia da polimerase**

Segundo Kosel et al. (2003), a PCR é considerada o método mais sensível para a detecção do DNA do HPV nas diversas formas de amostras tumorais. A PCR é uma técnica que revolucionou a virologia, devido à sua alta sensibilidade. Caracteriza-se pela amplificação

de quantidades diminutas da seqüência de DNA-alvo em milhões de vezes, consistindo num processo térmico cíclico que inclui três etapas: desnaturação da fita dupla do DNA, anelamento dos iniciadores (*primers*) com as suas seqüências complementares de DNA-alvo e extensão através da enzima DNA polimerase que gera novas fitas duplas de DNA idênticas às seqüências alvo de interesse. A partir de então, as duplas fitas recém geradas servem como modelos para um ciclo de PCR subsequente. Os *primers* podem ser específicos (detectam um subtipo viral específico) ou gerais (detectam diferentes subtipos virais) (CASTRO; BUSSOLOTI FILHO, 2006).

Todos os ensaios de PCR foram realizados em um volume de 25 µl. Nos microtubos devidamente identificados, foram acrescentados 5 µl do DNA genômico extraído, juntamente com 20 µl da mistura de reação, que consistiu em 12,5 µL de PCR Master Mix<sup>®</sup> (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 1,2 µL dos *primers* PC03 e PC04, 4,3 µL dos *primers* GP5+ e GP6+ e 2,0 µL de água ultrapura (Direct-Q<sup>™</sup> 5 Ultrapure Water Systems, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Todos os *primers* foram utilizados em uma concentração de 50 µM. Os reagentes, com exceção do DNA, foram misturados em um único tubo para garantir a homogeneidade das reações.

A solução de PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA) consiste em uma pré-mistura pronta para uso contendo Taq DNA polymerase (25 U/ml), dNTPs (400 µM de cada), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM) e uma solução tampão para a reação (pH 8,5).

A determinação da qualidade e da integridade das amostras de DNA genômico extraído, assim como a confirmação da ausência de agentes de inibidores da reação de PCR, foram comprovadas pela amplificação de um fragmento ubíquo de DNA que contém 110 pb, correspondente ao gene humano beta-globina (CHEHAB et al., 1987), utilizando os *primers* PC03 (5'-ACACA ACTGTGTTCACTAGC-3') e PC04 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3') (Bioneer Inc., Daejeon, Korea), descritos por Saiki et

al. (1986). Apenas as amostras com bandas visíveis para o fragmento do gene beta-globina foram incluídas neste estudo. Quando o primeiro corte investigado nas amostras era negativo, uma nova tentativa era realizada com o segundo.

Em todas as reações de PCR, foram utilizadas amostras de controle negativo e positivo para detecção de possíveis contaminações durante a reação. Para controle negativo da reação, ao invés das amostras de DNA genômico extraídas, foram utilizados 5 µl de água ultrapura (Direct-Q™ 5 Ultrapure Water Systems, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) juntamente com os 20 µl da mistura de reação. Para controle positivo, a amostra genômica foi substituída por uma mistura diluída contendo 5 µl de células em cultura infectadas por HPV-16 e HPV-18 (*Siha* e *Hela*, respectivamente), e adicionada com os 20 µl da mistura de reação.

#### 4.7.3. Amplificação e tipificação do HPV

A reação de amplificação para a detecção do HPV foi realizada utilizando-se os iniciadores GP5+ e GP6+ (GP5+ - 5'-TTTGTACTGTGGTAGATACTAC-3'; GP6+ - 5'-GAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') (Bioneer Inc., Daejeon, Korea), conforme descrito por De Roda Husman et al. (1995), amplificando um fragmento de aproximadamente 150 pb da região L1 do capsídeo viral, comum a todos os tipos de HPV.

Para a detecção do subtipo de HPV, foram utilizados os *primers* HPV-16E7.667 (5'-GATGAAATAGATGGTCCAGC-3') e HPV-16E7.774 (5'-GCTTTGTACGCACAACCGAAGC-3') para o HPV-16, e, para o HPV-18, os *primers* HPV-18E7.696 (5'-AAGAAAACGATGAAATAGATGGA-3') e HPV-18E7.799 (5'-GGCTTCACACTTACAACACA-3') (Bioneer Inc., Daejeon, Korea), conforme descritos por Walboomers et al. (1999), que amplificam fragmentos de aproximadamente 100 pb da região E7 dos DNAs virais.

Devido ao fato de que a amplificação de tecidos fixados em formol e arquivados em parafina serem menos eficiente que em amostras não processadas desta maneira, foi padronizado um programa de PCR personalizado para detecção geral e específica do HPV, com 40 ciclos de amplificação sendo realizados em um termociclador (PTC-100™, MJ Research, Watertown, MA, USA) da seguinte maneira: 1º ciclo – 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial, anelamento a 53°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos; os outros 39 ciclos seguintes foram realizados com 95°C por 1 minuto para desnaturação, anelamento a 51°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 2 minutos. Por último, uma extensão final de 72°C por 10 minutos sucedeu o último ciclo. Até a análise do produto amplificado, as amostras ficaram armazenadas em geladeira a 4°C.

#### **4.7.4. Separação eletroforética e análise do produto amplificado**

Para visualização dos produtos amplificados, as amostras foram aplicadas em géis verticais de poliacrilamida não desnaturantes de 10 cm, submetidos a condições eletroforéticas e corados conforme o método descrito por Sanguinetti et al. (1994). Para todas as análises, foi utilizado um marcador de DNA de 50 pb (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

Em um microtubo, foram misturados 5 µl da amostra amplificada a ser analisada com 5 µl de solução corante tampão (900 µl de bromofenol, 900 µl de xilenocianol, 900 µl de ácido bórico-EDTA (TBE) 10X, 4,5 ml de ficol 30%, 1,8 ml de EDTA 0,5M pH 8,0 e 3,6 gramas de sacarose). Esta mistura foi aplicada em um gel de poliacrilamida 8%, não desnaturante, juntamente com amostras dos controles negativo e positivo de cada reação.

O gel de poliacrilamida 8% não desnaturante foi feito diluindo-se a solução de estoque de acrilamida para a concentração desejada, solução de TBE 10X, glicerol e água destilada para um volume final de 20 ml. À mistura de gel foi adicionado 600 µl de solução saturada de

persulfato de potássio e 15 µl de tetrametiletilenodiamina (TEMED) como catalisadores da reação de polimerização e imediatamente verteu-se a mesma em um cassete de tamanho determinado montado previamente. Este cassete era composto por duas placas de vidro colocadas sobre um suporte, separadas por espaçadores de teflon de 1,5 mm de espessura presos com grampos de aço. Logo após verter-se o gel entre as placas, foi introduzido um pente de teflon na borda superior até a polimerização, aguardando um tempo mínimo de 20 minutos, para se formarem os sulcos nos quais posteriormente eram aplicadas as amostras.

O gel polimerizado foi montado em uma cuba de eletroforese vertical contendo tampão TBE (o mesmo utilizado na preparação do gel, diluído 10 vezes) em ambos os pólos. Após a mistura com o corante, as amostras foram aplicadas no gel, assim como os devidos padrões de peso molecular. Após este procedimento, o equipamento foi ligado a uma fonte de alta voltagem (250 volts) e submetido a 200 mA, constante, por um período de uma hora e meia.

Para revelação das bandas do material separado por eletroforese, foi utilizado o método preconizado por Sanguinetti et al. (1994). Neste método, a primeira etapa é a de fixação, onde o gel foi colocado em 100ml de solução fixadora por cinco minutos no agitador (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., Red Rocker, São Francisco, CA, USA). A impregnação com nitrato de prata foi realizada em seguida, adicionando-se 2 ml de nitrato de prata 20% em 100 ml de solução fixadora, permanecendo o gel em agitação por mais cinco minutos. Depois de descartada a solução fixadora com prata, o gel foi lavado uma vez em água corrente. Em seguida, foi colocada 200 ml de solução reveladora com 2 ml de formaldeído sobre o gel, o qual foi agitado até o aparecimento das bandas. Após o aparecimento das bandas, o gel foi fixado por 5 minutos em solução fixadora (sem nitrato de prata), para interromper o efeito revelador. Terminado este processo, procedeu-se a leitura do gel.

Após a leitura, os géis foram secos para serem arquivados. A secagem foi feita colocando-se o gel entre duas folhas de papel celofane embebidas em água, sobre uma placa de vidro e em temperatura ambiente por três dias.

#### **4.8. Análises estatísticas**

Uma análise estatística descritiva foi realizada para demonstrar a distribuição das variáveis de estudo na amostra. Para se correlacionar idade e gênero, os dados foram analisados estatisticamente com o teste não-paramétrico de Mann-Whitney, sendo que as outras comparações estatísticas das associações entre as variáveis foram realizadas utilizando-se os testes de Fischer ou o Qui-quadrado. Verificamos pelo método de Kaplan e Meier (1958), teste de Long-rank, as diferenças entre as curvas de sobrevida conforme as variáveis analisadas. Os referidos testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism, versão 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Os testes da análise multivariada (Regressão de Cox) foram realizados com o programa Epi Info™ for Windows 3.4, desenvolvido pelo Centro para Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Atlanta, GA, USA). Foram selecionados 87 pacientes que possuíam informações sobre todas as variáveis do estudo para a construção de modelos estatísticos para investigação dos grupos de variáveis independentes com características prognósticas preditivas. Os cálculos das *Odds Ratios* (OR) e seus respectivos intervalos de confiança (IC) também foram realizados para aferição da intensidade da associação das variáveis com o prognóstico da doença. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

#### **4.9. Reagentes e soluções**

Os reagentes e as soluções utilizados neste trabalho estão descritos no Anexo C.



## 5. RESULTADOS

Foram encontrados 424 casos de CEO diagnosticados por biópsia entre 1982 e 2002, período equivalente a 21 anos. Os dados coletados dos prontuários dos pacientes (idade, gênero, localização e tamanho tumoral primário, consumo de tabaco e bebidas alcoólicas, traumatismo por prótese, classificação histológica, recidivas, metástases, óbitos, exposição actínica e história pregressa da lesão) encontram-se na Tabela 2.

A Tabela 2 ilustra os pacientes com CEO que relataram em seus prontuários trauma crônico causado por prótese dentária removível conforme a região anatômica. Nos 180 (42,5% do total) pacientes que faziam uso de próteses removíveis, o traumatismo crônico foi relatado por 55 (30,6%) e os outros 125 (69,4%) negaram qualquer tipo de trauma. Analisando a presença deste trauma crônico de acordo com a localização anatômica primária do CEO, foi encontrada uma diferença significativa entre as cinco topografias avaliadas (excluindo-se as neoplasias de lábio inferior), com  $P < 0,0001$ . O palato duro foi a localização anatômica mais relacionada, sendo a única em que predominaram os relatos da presença do trauma crônico, contando com 22 (40%) dos 55 pacientes que relataram o trauma.

Com relação aos 332 (78,3% do total) pacientes tabagistas, 29 (8,7%) relataram consumir cigarros de palha, 15 (4,5%) afirmaram fumar cachimbo e 5 (1,5%) revelaram o hábito de mascar fumo, sendo que os 283 (85,3%) restantes relataram o consumo de cigarros industrializados. Já os pacientes classificados como etilistas consumiam predominantemente cerveja e destilados (cachaça). A informação não estava disponível em 39 prontuários analisados. Não foi encontrada uma diferença significativa entre as regiões anatômicas avaliadas ao analisar os pacientes conforme o consumo de tabaco, álcool, ambos ou nenhum ( $P = 0,187$ ), conforme demonstrado na Tabela 2.

A associação da localização anatômica com as recidivas e metástases regionais nos pacientes estudados está demonstrada na Tabela 2, já a associação de metástases à distância conforme a localização anatômica está descrita na Tabela 5. Não foi encontrada diferença significativa entre as diferentes localizações anatômicas ao analisar a ocorrência de recidivas ( $P=0,222$ ), metástases regionais ( $P=0,159$ ) e à distância ( $P=0,296$ ).

Tabela 2 – Características clinicopatológicas dos 424 pacientes com carcinoma epidermóide oral investigados conforme a localização tumoral anatômica primária (%).

CARACTERÍSTICA	LOCALIZAÇÃO TUMORAL PRIMÁRIA						TOTAL
	Língua	Assoalho	Láb.Inf.	Palato	Retromolar	Outras*	
	<b>122 (28,8)</b>	<b>109 (25,7)</b>	<b>70 (16,5)</b>	<b>63 (14,8)</b>	<b>30 (7,1)</b>	<b>30 (7,1)</b>	<b>424 (100)</b>
Idade (anos)							
≤ 40	27 (22,1)	10 (9,2)	3 (4,3)	4 (6,4)	3 (10)	4 (13,3)	51 (12)
41 – 60	56 (45,9)	53 (48,6)	47 (67,1)	45 (71,4)	20 (66,7)	11 (36,7)	232 (54,7)
> 60	39 (32)	46 (42,2)	20 (28,6)	14 (22,2)	7 (23,3)	15 (50)	141 (33,3)
Gênero							
masculino	102 (83,6)	87 (79,8)	63 (90)	48 (76,2)	22 (73,3)	26 (86,7)	348 (82,1)
feminino	20 (16,4)	22 (20,2)	7 (10)	15 (23,8)	8 (26,7)	4 (13,3)	76 (17,9)
Hábitos de consumo							
tabagismo	26 (21,3)	17 (15,6)	11 (15,7)	15 (23,8)	10 (33,3)	13 (43,3)	92 (21,7)
etilismo	6 (4,9)	5 (4,6)	5 (7,2)	3 (4,8)	3 (10)	1 (3,3)	23 (5,4)
ambos	71 (58,2)	64 (58,7)	40 (57,1)	38 (60,3)	14 (46,7)	13 (43,3)	240 (56,6)
nenhum	8 (6,6)	9 (8,3)	8 (11,4)	3 (4,8)	2 (6,7)	–	30 (7,1)
sem informação	11 (9)	14 (12,8)	6 (8,6)	4 (6,3)	1 (3,3)	3 (10)	39 (9,2)
Traumatismo por prótese							
presente	9 (7,4)	14 (12,8)	–	22 (34,9)	4 (13,3)	6 (20)	55 (13)
ausente	44 (36,1)	39 (35,8)	14 (20)	8 (12,7)	11 (36,7)	9 (30)	125 (29,5)
não usa prótese	69 (56,5)	56 (51,4)	56 (80)	33 (52,4)	15 (50)	15 (50)	244 (57,5)
Diferenciação histológica							
Bem	56 (45,9)	58 (53,2)	36 (51,4)	22 (35)	15 (50)	13 (43,3)	201 (47,4)
moderada	51 (41,8)	40 (36,7)	32 (45,7)	28 (44,4)	11 (36,7)	13 (43,3)	174 (41)
Pouco	15 (12,3)	11 (10,1)	2 (2,9)	13 (20,6)	4 (13,3)	4 (13,3)	49 (11,6)
Recidiva							
sim	34 (27,9)	46 (42,2)	14 (20)	17 (27)	10 (33,3)	6 (20)	127 (30)
não	88 (72,1)	63 (57,8)	56 (80)	46 (73)	20 (66,7)	24 (80)	297 (70)
Metástase							
sim	31 (25,4)	40 (36,7)	13 (18,6)	19 (30,2)	9 (30)	10 (33,3)	122 (28,8)
não	91 (74,6)	69 (63,3)	57 (81,4)	44 (69,8)	21 (70)	20 (66,7)	302 (71,2)
Óbito							
sim	14 (11,5)	19 (17,4)	4 (5,7)	9 (14,3)	6 (20)	4 (13,3)	56 (13,2)
não	108 (88,5)	90 (82,6)	66 (94,3)	54 (85,7)	24 (80)	26 (86,7)	368 (86,8)

\* Outras localizações anatômicas incluem mucosa jugal, gengiva e lábio superior.

Tabela 3 – Distribuição dos pacientes estudados conforme o tamanho e a localização do tumor primário no momento da biópsia inicial (%).

TAMANHO DO TUMOR PRIMÁRIO <sup>†</sup>	LOCALIZAÇÃO TUMORAL PRIMÁRIA						
	Língua	Assoalho	Láb.Inf.	Palato	Retromolar	Outras*	Total
T1	11 (9)	9 (8,3)	6 (8,6)	10 (15,9)	6 (20)	7 (23,3)	49 (11,5)
T2	54 (44,3)	49 (44,9)	42 (60)	42 (66,7)	11 (36,7)	10 (33,3)	208 (49,1)
T3	48 (39,3)	41 (37,6)	21 (30)	7 (11,1)	11 (36,7)	13 (43,3)	141 (33,3)
T4	9 (7,4)	10 (9,2)	1 (1,4)	4 (6,3)	2 (6,6)	–	26 (6,1)
<b>Total</b>	<b>122 (28,8)</b>	<b>109 (25,7)</b>	<b>70 (16,5)</b>	<b>63 (14,8)</b>	<b>30 (7,1)</b>	<b>30 (7,1)</b>	<b>424 (100)</b>

\*Outras localizações anatômicas incluem mucosa jugal, gengiva e lábio superior. <sup>†</sup> Conforme classificação TNM (SOBIN; WITTEKIND, 2002).

O gênero dos pacientes foi relatado em todos os prontuários, sendo 348 (82,1%) homens e 76 (17,9%) mulheres, resultando numa proporção masculino:feminino de 4,6:1. As idades na época do diagnóstico variaram de 27 a 91 anos, com uma idade média de 61 anos (58 anos para homens e 63 anos para mulheres). A diferença na idade de incidência do CEO foi significativa em relação ao gênero ( $P=0,031$ ), havendo uma tendência de afetar mais tardiamente as mulheres (Tabela 4). Devido a esse fato, a relação entre os gêneros (masculino:feminino) mostrou uma variação de acordo com a idade dos pacientes, sendo de 6,3:1 até os 60 anos e diminuindo para 2,8:1 após esta idade.

Tabela 4 – Distribuição do número e porcentagem de pacientes segundo a idade e o gênero.

IDADE <sup>‡</sup>	GÊNERO		
	Masculino	Feminino	TOTAL
≤ 60 anos	244 (70,1)	39 (51,3)	283 (66,7)
> 60 anos	104 (29,9)	37 (48,7)	141 (33,3)

<sup>‡</sup> De acordo com (SARINI et al., 2001).

Tabela 5 – Distribuição dos pacientes com ocorrência de metástases à distância conforme a localização anatômica tumoral primária e os órgãos afetados (%).

	LOCALIZAÇÃO TUMORAL PRIMÁRIA						Total
	Língua	Assoalho	Láb.Inf.	Palato	Retromolar	Outras*	
	<b>122 (28,8)</b>	<b>109 (25,7)</b>	<b>70 (16,5)</b>	<b>63 (14,8)</b>	<b>30 (7,1)</b>	<b>30 (7,1)</b>	<b>424 (100)</b>
Metástase à distância							
sim	7 (5,7)	7 (6,4)	-	3 (4,8)	1 (3,3)	3 (10)	21 (4,9)
não	115 (94,3)	102 (93,6)	70 (100)	60 (95,2)	29 (96,7)	27 (90)	403 (95,1)
Órgãos afetados							
pulmões	6 (85,7)	5 (71,4)	-	2 (100)	1 (100)	3 (100)	17 (80,9)
fígado	1 (14,3)	1 (14,3)	-	-	-	-	2 (9,5)
ossos	-	1 (14,3)	-	-	-	-	1 (4,8)
olhos	-	-	-	1	-	-	1 (4,8)

\*Outras localizações anatômicas são mucosa jugal, gengiva e lábio superior.

A história pregressa das lesões até a procura pelo serviço está demonstrada na Figura 2. Embora a maioria dos pacientes tenha procurado cuidados médicos nos primeiros seis meses de evolução da doença, o tempo médio encontrado foi de 13 meses. Conforme demonstrado na Figura 3, foi encontrada diferença significativa entre a localização anatômica tumoral primária e a história pregressa das lesões ( $P < 0,0001$ ), sendo que houve maior atraso no diagnóstico dos tumores em lábio inferior.

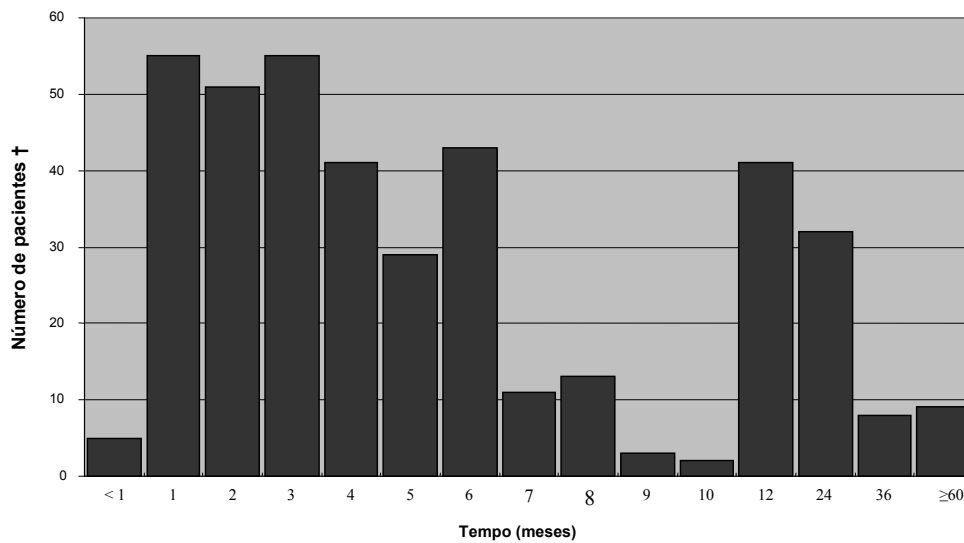


Figura 2 – História progressiva da evolução dos tumores primários até a procura do serviço pelos pacientes (N = 398).

† Dados indisponíveis em 26 prontuários analisados.

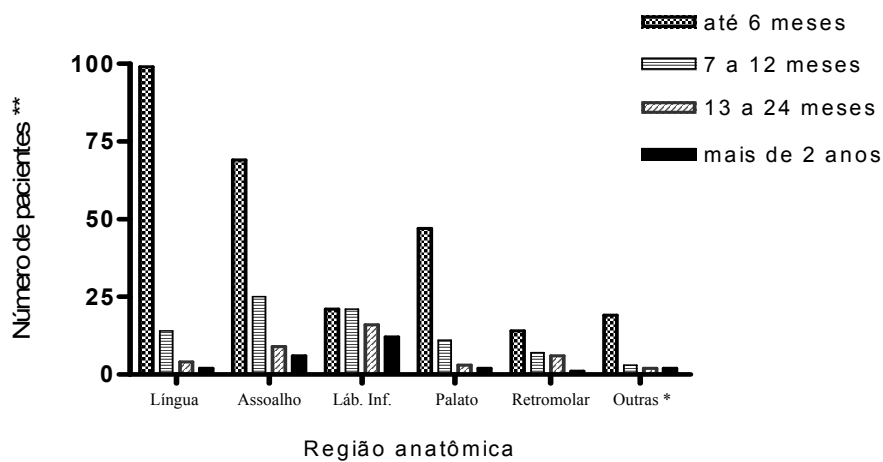


Figura 3 – História progressiva das lesões conforme a localização anatômica tumoral primária.

\* Outras localizações anatômicas são mucosa jugal, gengiva e lábio superior. \*\* Dados indisponíveis em 26 prontuários analisados.

Com relação ao principal fator de risco para o CEO em lábio inferior, a exposição actínica desprotegida foi relatada por 51 (72,9%) dos pacientes, sendo que cinco (7,1%) negaram tal exposição e em 14 (20%) prontuários não havia esta informação (Figura 4). O

consumo de tabaco pelos pacientes estudados não apresentou influência estatisticamente significativa nas recidivas e metástases da doença ( $P=1,0$ ) (Figura 5).

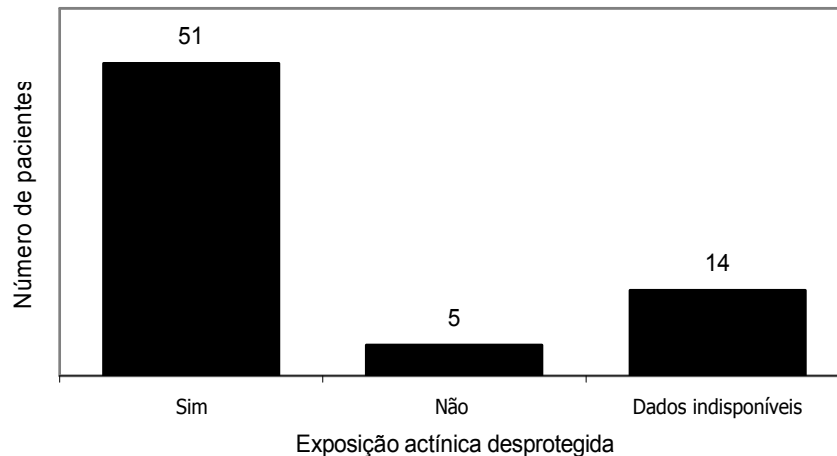


Figura 4 – Relatos de exposição actínica desprotegida nos 70 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide em lábio inferior.

### 5.1. Estudo da Sobrevida

Para o estudo da sobrevida, foram selecionados 126 (29,7%) pacientes do total estudado que tiveram o devido acompanhamento relatado em seus prontuários e enquadravam-se nos critérios do estudo. Além dos 26 (6,1%) pacientes que se apresentaram com tumores primários T4 (Tabela 3), outros 272 (64,2%) pacientes não puderam ser incluídos no estudo da sobrevida porque não possuíam informações suficientes em seus prontuários médicos. As informações clinicopatológicas dos pacientes selecionados para este estudo estão sumarizadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Características clinicopatológicas dos 126 pacientes com carcinoma epidermóide oral selecionados para o estudo da sobrevida (%).

CARACTERÍSTICA	LOCALIZAÇÃO TUMORAL PRIMÁRIA						Total
	Língua	Assoalho	Láb.Inf.	Palato	Retromolar	Outras*	
	<b>39 (31)</b>	<b>38 (30,2)</b>	<b>13 (10,3)</b>	<b>13 (10,3)</b>	<b>12 (9,5)</b>	<b>11 (8,7)</b>	<b>126 (100)</b>
Idade (anos)							
≤ 60	26 (66,7)	21 (55,3)	7 (53,8)	6 (46,2)	7 (58,3)	6 (54,5)	73 (57,9)
> 60	13 (33,3)	17 (44,7)	6 (46,2)	7 (53,8)	5 (41,7)	5 (45,5)	53 (42,1)
Gênero							
masculino	28 (71,8)	29 (76,3)	10 (76,9)	8 (61,5)	10 (83,3)	10 (91)	95 (75,4)
feminino	11 (28,7)	9 (23,7)	3 (23,1)	5 (38,5)	2 (16,7)	1 (9)	31 (24,6)
Hábitos de consumo							
tabagismo	8 (20,5)	8 (21,1)	3 (23,1)	4 (30,9)	3 (25)	5 (45,5)	31 (24,6)
etilismo	2 (5,1)	2 (5,3)	1 (7,6)	2 (15,4)	1 (8,3)	1 (9)	9 (7,1)
ambos	26 (66,7)	25 (65,7)	5 (38,5)	5 (38,5)	5 (41,7)	5 (45,5)	71 (56,3)
nenhum	1 (2,6)	2 (5,3)	2 (15,4)	1 (7,6)	1 (8,3)	–	7 (5,6)
sem informação	2 (5,1)	1 (2,6)	2 (15,4)	1 (7,6)	2 (16,7)	–	8 (6,4)
Recidiva							
sim	11 (28,2)	13 (34,2)	3 (23,1)	4 (30,8)	4 (33,3)	9 (81,8)	44 (34,9)
não	28 (71,8)	25 (65,8)	10 (76,9)	9 (69,2)	8 (66,7)	2 (18,2)	82 (65,1)
Metástase							
sim	18 (46,2)	20 (52,6)	3 (23,1)	6 (46,2)	6 (50)	6 (54,5)	59 (46,8)
não	21 (53,8)	18 (47,4)	10 (76,9)	7 (53,8)	6 (50)	5 (45,5)	67 (53,2)
Óbito							
sim	4 (10,3)	7 (18,4)	1 (7,6)	3 (23,1)	3 (25)	2 (18,2)	20 (15,9)
não	35 (89,7)	31 (81,6)	12 (92,4)	10 (76,9)	9 (75)	9 (81,8)	106 (84,1)

\* Outras localizações anatômicas são mucosa jugal, gengiva e lábio superior.

A taxa de SG em cinco anos nos pacientes estudados foi de 24,3% (desvio padrão de 6,9%), com média de 28 meses (Figura 5). Por outro lado, a taxa de SLD em cinco anos foi de 19% (desvio padrão de 4,1%), com média de 19 meses.

Analisando a sobrevida nos pacientes com recidivas e/ou metástases, ou aqueles com ausência de ambos (Figura 6), encontramos uma diferença significativa nas curvas de sobrevida ( $P < 0,0001$ ). A comparação entre as curvas do tempo de sobrevida também foi estatisticamente diferente segundo a idade analisada ( $\leq 60$  ou  $> 60$  anos), com  $P=0,002$



(Figura 7). Por outro lado, não houve diferença significativa de sobrevida entre as quatro localizações anatômicas tumorais de maior prevalência ( $P=0,139$ ) (Figura 8).

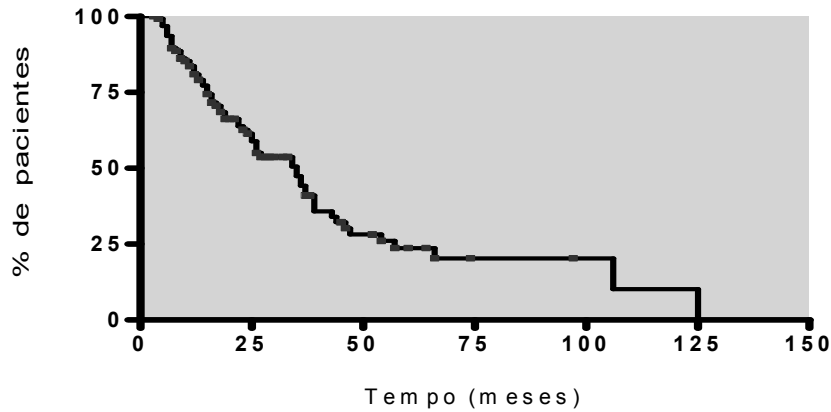


Figura 5 – Sobrevida global dos pacientes estudados.

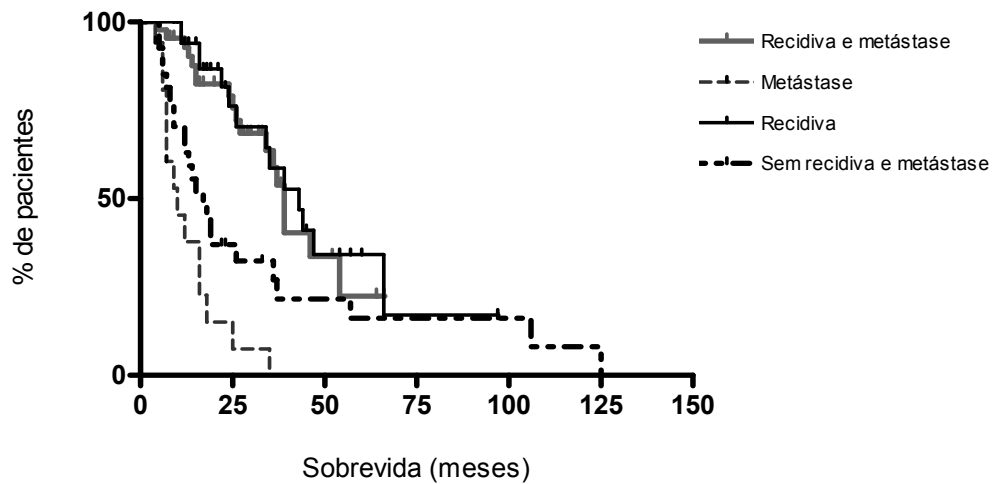


Figura 6 – Sobrevida dos pacientes com recidivas, metástases, recidivas e metástases ou ausência de ambos.

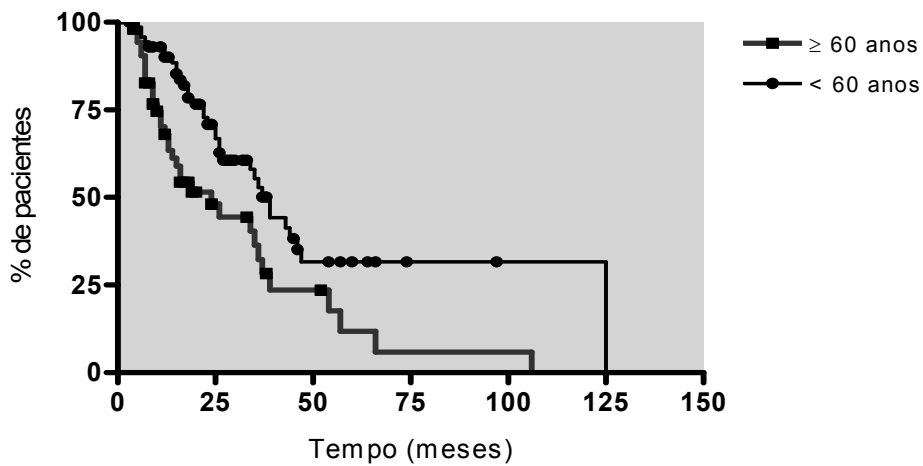


Figura 7 – Sobrevida dos pacientes classificados conforme a idade.

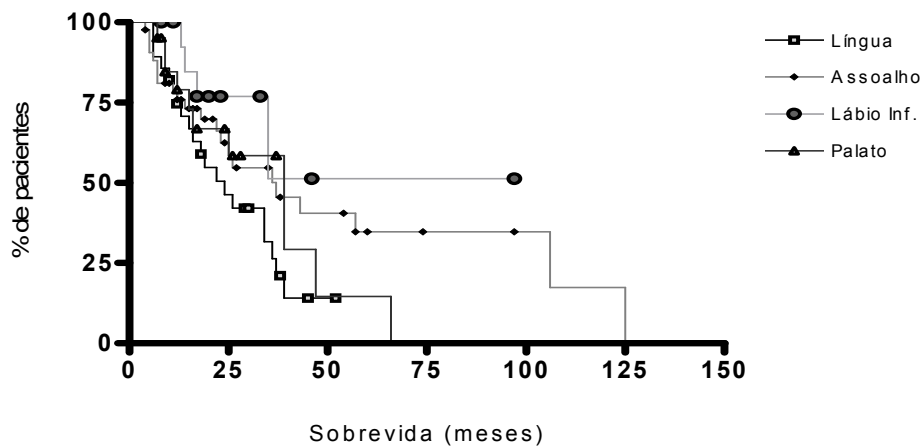


Figura 8 – Sobrevida dos pacientes conforme as quatro localizações anatômicas tumorais primárias de maior prevalência.

## 5.2. Estudo imunohistoquímico

Para o estudo da imunohistoquímica, foram selecionados 106 (25%) pacientes do total estudado que se enquadravam nos critérios do estudo. As informações clinicopatológicas dos pacientes selecionados para este estudo estão sumarizadas na Tabela 7.

Tabela 7 – Características clinicopatológicas dos pacientes selecionados para o estudo imunohistoquímico (%).

CARACTERÍSTICA	LOCALIZAÇÃO TUMORAL PRIMÁRIA					Total
	Língua	Assoalho	Láb.Inf.	Palato	Outras*	
	25 (23,6)	34 (32,1)	15 (14,1)	21 (19,8)	11 (10,4)	<b>106 (100)</b>
Idade (anos)						
≤ 60	15 (60)	27 (79,4)	7 (46,7)	13 (61,9)	5 (45,5)	<b>67 (63,2)</b>
> 60	10 (40)	7 (20,6)	8 (53,3)	8 (38,1)	6 (54,5)	<b>39 (36,8)</b>
Gênero						
masculino	19 (76)	30 (88,2)	12 (80)	19 (90,6)	9 (81,8)	<b>89 (84)</b>
feminino	6 (24)	4 (11,8)	3 (20)	2 (9,4)	2 (18,2)	<b>17 (16)</b>
Diferenciação histológica						
bem	11 (44)	19 (55,9)	8 (53,3)	5 (23,8)	5 (45,5)	<b>48 (45,3)</b>
moderada	10 (40)	9 (26,5)	7 (46,7)	11 (52,4)	4 (36,4)	<b>41 (38,7)</b>
pobre	4 (16)	6 (17,6)	-	5 (23,8)	2 (18,1)	<b>17 (16)</b>
Recidiva						
não	13 (52)	15 (44,1)	5 (33,3)	10 (47,6)	4 (36,4)	<b>47 (44,3)</b>
sim	12 (48)	19 (55,9)	10 (66,7)	11 (52,4)	7 (63,6)	<b>59 (55,7)</b>
Metástase						
não	11 (44)	7 (20,6)	6 (40)	10 (47,6)	3 (27,3)	<b>37 (34,9)</b>
sim	14 (56)	27 (79,4)	9 (60)	11 (52,4)	8 (72,7)	<b>69 (65,1)</b>

\* Outras localizações anatômicas são mucosa jugal, trígono retromolar, gengiva e lábio superior.

A imunoreatividade para p63 esteve presente em 93 (87,8%) tumores (Tabela 8), sendo que o índice de positividade celular variou de 0% a 100%. A distribuição quantitativa e a intensidade da imunexpressão de p63 estão especificadas nas Tabelas 8 e 9, respectivamente. A imunoreatividade de p63 foi notada principalmente em tumores bem e moderadamente diferenciados. No entanto, sua imunexpressão mostrou-se geralmente ausente em células com diferenciação terminal e em áreas com pérolas de queratina (Figura 9). Para a proteína p53, 56 (52,8%) dos tumores (Figura 10) mostraram-se positivos, sendo que a maioria dos tumores negativos mostrou um padrão bem diferenciado (Tabela 10).

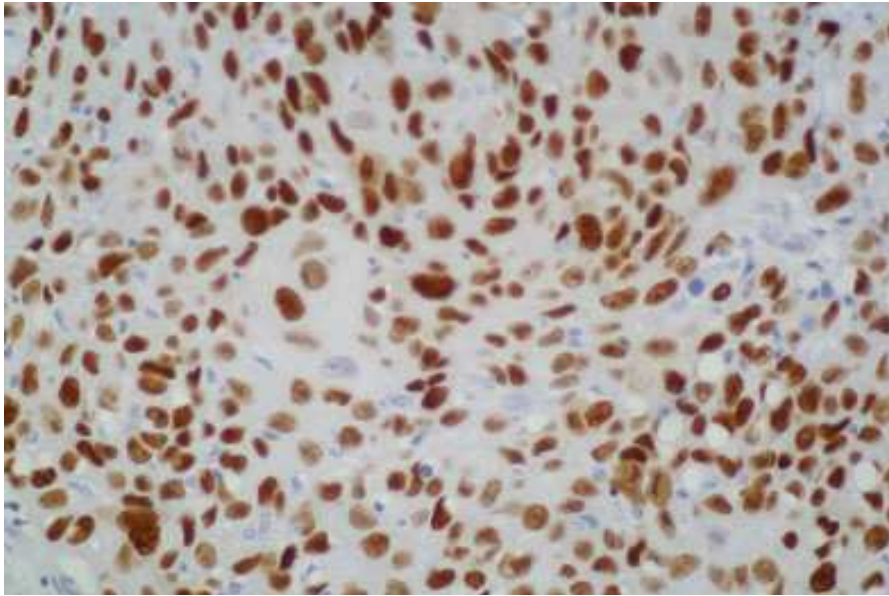


Figura 9 – Fotomicrografia de células tumorais positivas para a proteína p63 (marcação nuclear escura, imunohistoquímica, x40).

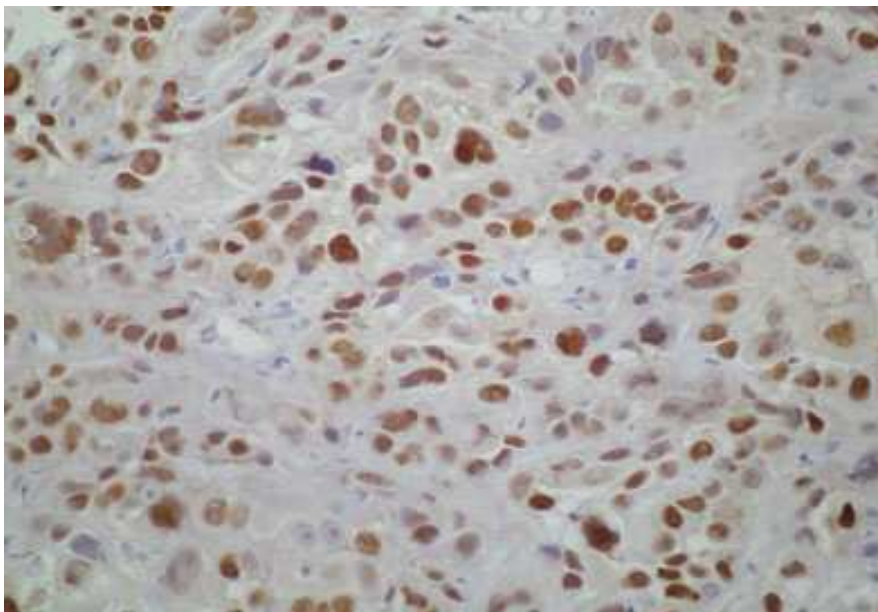


Figura 10 – Fotomicrografia de células tumorais positivas para a proteína p53 (marcação nuclear escura, imunohistoquímica, x40).

Tabela 8 – Distribuição quantitativa da imunexpressão da proteína p63 associada com o padrão de diferenciação tumoral e com os episódios de recidivas e metástases (%).

	Imunexpressão quantitativa de p63					Total
	0	1	2	3	4	
<b>Casos</b>	13 (12,2)	26 (24,6)	23 (21,7)	17 (16)	27 (25,5)	106 (100)
Diferenciação tumoral						
bem	2 (15,4)	9 (34,6)	9 (39,1)	11 (64,7)	17 (63)	48 (45,3)
moderada	3 (23,1)	12 (46,2)	12 (52,2)	5 (29,4)	9 (33,3)	41 (38,7)
pouco	8 (61,5)	5 (19,2)	2 (8,7)	1 (5,9)	1 (3,7)	17 (16)
Recidivas						
não	8 (61,5)	8 (30,8)	7 (30,4)	11 (64,7)	13 (48,1)	47 (44,3)
sim	5 (38,5)	18 (69,2)	16 (69,6)	6 (35,3)	14 (51,9)	59 (55,7)
Metástases						
não	4 (30,8)	4 (15,4)	7 (30,4)	7 (41,2)	15 (55,6)	37 (34,9)
sim	9 (69,2)	22 (84,6)	16 (69,6)	10 (58,8)	12 (44,4)	69 (65,1)

Não houve associação estatisticamente significativa entre a distribuição quantitativa da imunexpressão da proteína p63 com recidivas e metástases tumorais (Tabela 8,  $P=0,439$  e  $P=0,687$ , respectivamente). Nos tumores menos diferenciados, foi encontrada uma tendência para a ausência ou baixa imunexpressão de p63 ( $P=0,719$ ).

Com relação à intensidade da imunexpressão de p63, os casos com fraca imunoreatividade mostraram maior número de metástases do que aqueles com intensidade forte (Tabela 9). No entanto, não houve associação significativa entre a intensidade de imunexpressão de p63 com a ocorrência de metástases e recidivas tumorais ( $P=0,244$  e  $P=0,172$ , respectivamente). Do mesmo modo, nenhum resultado significativo foi encontrado com relação ao grau de diferenciação tumoral ( $P=0,397$ ).

Tabela 9 – Distribuição da intensidade da imunopressão da proteína p63 associada com o padrão de diferenciação tumoral e com os episódios de recidivas e metástases (%).

	Imunopressão quantitativa de p63				Total
	0	+	++	+++	
<b>Casos</b>	13 (12,2)	20 (18,9)	53 (50)	20 (18,9)	106 (100)
Diferenciação tumoral					
bem	2 (15,4)	8 (40)	26 (49,1)	12 (60)	48 (45,3)
moderada	3 (23,1)	8 (40)	23 (43,4)	7 (35)	41 (38,7)
pouco	8 (61,5)	4 (20)	4 (7,5)	1 (5)	17 (16)
Recidivas					
não	8 (61,5)	5 (25)	24 (45,3)	10 (50)	47 (44,3)
sim	5 (38,5)	15 (75)	29 (54,7)	10 (50)	59 (55,7)
Metástases					
não	4 (30,8)	2 (10)	19 (35,8)	12 (60)	37 (34,9)
sim	9 (69,2)	18 (90)	34 (64,2)	8 (40)	69 (65,1)

Para a análise da imunopressão da proteína p53, nenhum resultado significativo foi encontrado ao se avaliar os episódios de recidivas tumorais e o grau de diferenciação tumoral (Tabela 10,  $P=0,845$  e  $P=0,156$ , respectivamente). Por outro lado, foi encontrada uma associação significativa entre a imunopressão de p53 e a ocorrência de metástases ( $P=0,002$ ), com predomínio nos casos p53 positivos, que mostraram alto índice de metástases (78,6%).

Tabela 10 – Distribuição da imunopressão da proteína p53 associada com o padrão de diferenciação tumoral e com os episódios de recidivas e metástases (%).

	Imunopressão de p53		
	Positivo	Negativo	Total
<b>Casos</b>	56 (52,8)	50 (47,2)	106 (100)
Diferenciação tumoral			
bem	21 (37,5)	27 (54)	48 (45,3)
moderada	22 (39,3)	19 (38)	41 (38,7)
pobre	13 (23,2)	4 (8)	17 (16)
Recidivas			
não	24 (42,9)	23 (46)	47 (44,3)
sim	32 (57,1)	27 (54)	59 (55,7)
Metástases			
não	12 (21,4)	25 (50)	37 (34,9)
sim	44 (78,6)	25 (50)	69 (65,1)

Nenhuma associação significativa foi encontrada entre a imunoposição quantitativa de p63 e p53 ( $P=0,438$ ). Na análise entre a intensidade de imunoposição de p63 com p53, os casos de p63 com intensidade moderada e forte foram na maioria p53 negativos (78%), mas também sem alcançar resultados estatísticos significativos ( $P=0,212$ ), conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 – Associação entre a imunoposição das proteínas p53 e p63 nos casos estudados.

	Imunoposição de p53		
	positivos	negativos	Total
<b>Casos</b>	<b>56 (52,8)</b>	<b>50 (47,2)</b>	<b>106 (100)</b>
<b>Imunoposição de p63</b>			
Ausente	9 (16,1)	4 (8)	<b>13 (12,2)</b>
<b>Imunoposição quantitativa de p63</b>			
1 (1-25%)	8 (14,3)	18 (36)	<b>26 (24,6)</b>
2 (26-50%)	12 (21,4)	11 (22)	<b>23 (21,7)</b>
3 (51-75%)	9 (16,1)	8 (16)	<b>17 (16)</b>
4 (76-100%)	18 (32,1)	9 (18)	<b>27 (25,5)</b>
<b>Intensidade de imunoposição de p63</b>			
+ (fraca)	13 (23,2)	7 (14)	<b>20 (18,9)</b>
++ (moderada)	28 (50)	25 (50)	<b>53 (50)</b>
+++ (forte)	6 (10,7)	14 (28)	<b>20 (18,9)</b>

O índice de SG em cinco anos para a população estudada foi de 32% (desvio padrão de 7,3%), e a sobrevida média foi de 35 meses. Por outro lado, a taxa de SLD em cinco anos foi de 10% (desvio padrão de 3,4%), com uma SLD média de 19 meses.

Apesar de não ter sido encontrada nenhuma influência significativa nas curvas de sobrevida, a análise quantitativa de p63 mostrou tendência para os casos de maior quantidade

de imunexpressão – classificados como 4 (75-100%) – com intervalos mais favoráveis de SLD e SG (P=0,271 e P=0,184, respectivamente), conforme ilustrado na Figuras 11 e 12.

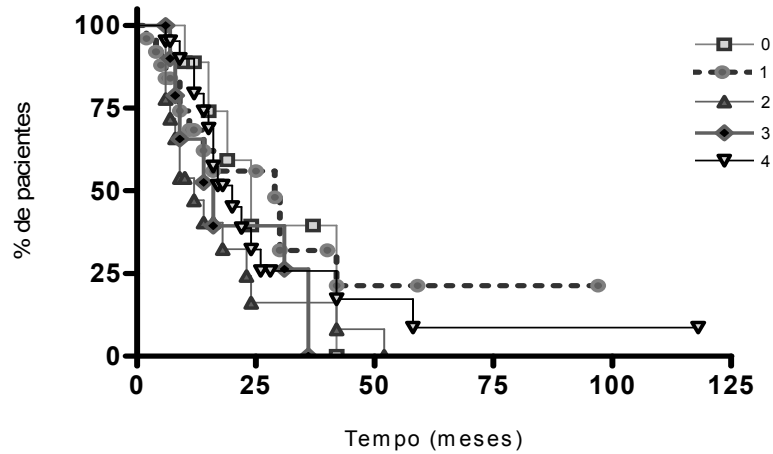


Figura 11 – Análise das curvas de sobrevida livre da doença conforme a imunexpressão quantitativa da proteína p63.

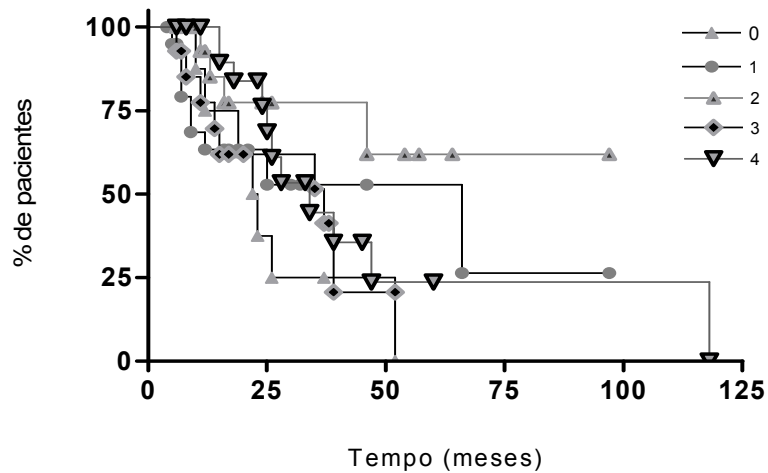


Figura 12 – Análise das curvas de sobrevida global conforme a imunexpressão quantitativa da proteína p63.



Apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas ( $P=0,406$ ), os tumores com forte intensidade de imunexpressão da proteína p63 tiveram os melhores intervalos de SLD e os tumores com ausência de p63 tiveram os intervalos mais curtos (Figura 13). Em relação as curvas de SG, uma significativa associação foi encontrada entre a maior intensidade de imunexpressão de p63 com melhores índices de SG ( $P=0,008$ ), como demonstrado na Figura 14.

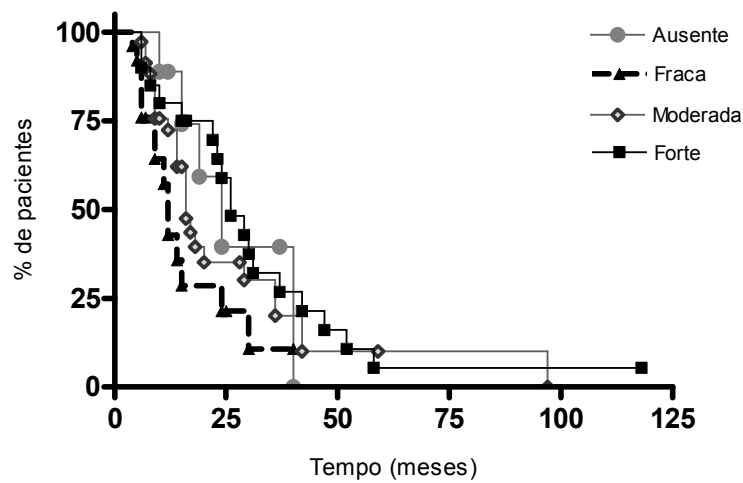


Figura 13 – Análise das curvas de sobrevida livre da doença conforme a intensidade de imunexpressão da proteína p63.

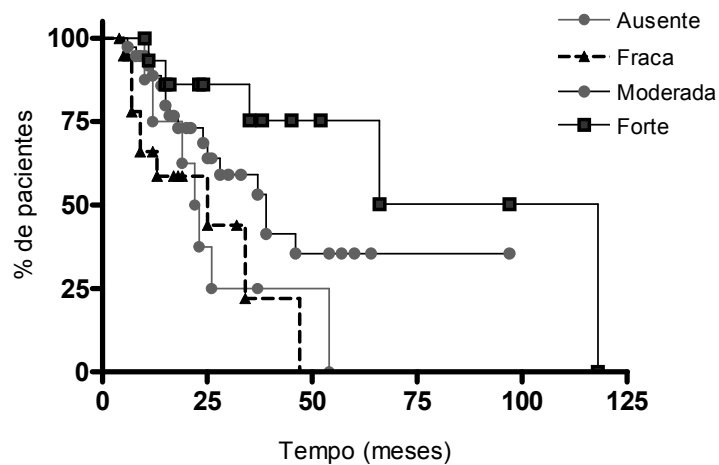


Figura 14 – Análise das curvas de sobrevida global conforme a intensidade de imunexpressão da proteína p63.

Nenhuma diferença significativa foi encontrada para as curvas de sobrevida avaliando a imunoreatividade da proteína p53 em relação a SLD ( $P=0,334$ ) (Figura 15). No entanto, em relação a SG, os pacientes com ausência da imunoposição de p53 tiveram um prognóstico significativamente melhor ( $P=0,046$ ), conforme ilustrado na Figura 16.

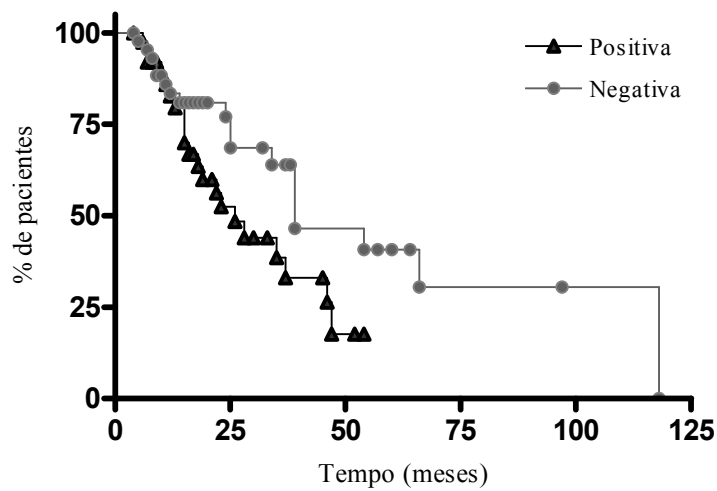


Figura 15 – Análise das curvas de sobrevida livre da doença conforme a imunoposição da proteína p53.

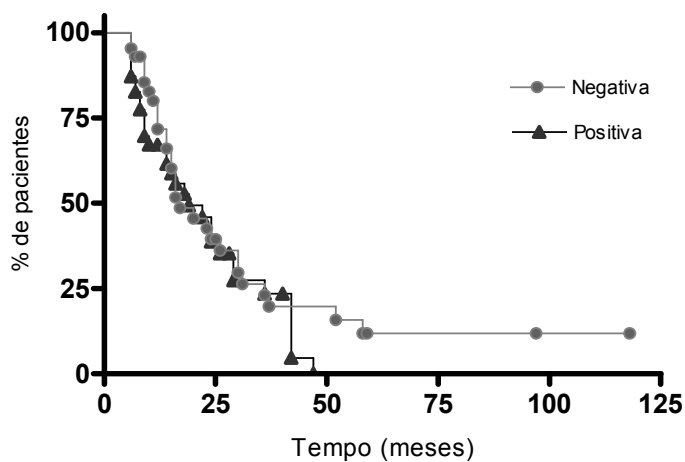


Figura 16 – Análise das curvas de sobrevida global conforme a imunoposição da proteína p53.

### 5.3. Estudo imunohistoquímico com amostras pareadas

As características da população selecionada para este estudo (localização tumoral primária, idade, gênero e óbitos) estão descritas na Tabela 12.

Tabela 12 – Características demográficas e clinicopatológicas dos pacientes com carcinoma epidermóide oral selecionados para o estudo com amostras pareadas.

LOCALIZAÇÃO TUMORAL PRIMÁRIA						
	Assoalho	Língua	Palato	Lábio Inferior	Outras <sup>†</sup>	TOTAL
<b>CASOS</b>	14 (31,1)	12 (26,7)	8 (17,8)	6 (13,3)	5 (11,1)	<b>45 (100)</b>
<b>IDADE</b>						
≤ 60	11 (78,6)	7 (58,3)	3 (37,5)	3 (50)	3 (60)	<b>27 (60)</b>
> 60	3 (21,4)	5 (41,7)	5 (62,5)	3 (50)	2 (40)	<b>18 (40)</b>
<b>GÊNERO</b>						
masculino	12 (85,7)	11 (91,7)	7 (87,5)	5 (83,3)	3 (60)	<b>38 (84,4)</b>
feminino	2 (14,3)	1 (8,3)	1 (12,5)	1 (16,7)	2 (40)	<b>7 (15,6)</b>
<b>ÓBITO</b>						
não	7 (50)	4 (33,3)	4 (50)	3 (50)	3 (60)	<b>21 (46,7)</b>
sim	7 (50)	8 (66,7)	4 (50)	3 (50)	2 (40)	<b>24 (53,3)</b>

<sup>†</sup> Outras localizações anatômicas incluem trígono retromolar, mucosa jugal, lábio superior e gengiva

A análise imunohistoquímica mostrou imunopositividade das proteínas p53 e p63 em 17 (37,8%) e 23 (51,1%) dos TP, respectivamente. Para as ML, um aumento na imunopositividade de ambas as proteínas foi registrado, subindo para 23 (51,1%) e 26 (57,8%) casos para p53 e p63, respectivamente.

Analisando o grau histológico de diferenciação dos tumores conforme a imunopositividade das proteínas, foi encontrada uma fraca associação entre a positividade aumentada de p53 com o baixo nível de diferenciação tumoral. No entanto, esta associação

não demonstrou resultados estatisticamente significativos ( $P=0,318$  e  $P=0,080$ , para p53 e p63, respectivamente) (Tabela 13).

Tabela 13 – Grau de diferenciação histológico tumoral em todas as amostras estudadas agrupados conforme os resultados de imunexpressão das proteínas p53 e p63 (%).

DIFERENCIAÇÃO HISTOLÓGICA	p53		p63		TOTAL
	+	-	+	-	
<b>BEM</b>	16 (36,4)	28 (63,6)	17 (38,6)	27 (61,4)	<b>44 (100)</b>
<b>MODERADA</b>	16 (51,6)	15 (48,4)	20 (64,5)	11 (35,5)	<b>31 (100)</b>
<b>POUCO</b>	8 (53,3)	7 (46,7)	6 (40)	9 (60)	<b>15 (100)</b>

A maioria dos casos demonstrou concordância nos padrões de imunexpressão de ambas as proteínas, mantendo o modelo de imunexpressão do TP na ML. Para p53, a concordância foi de 73,3% (33 casos), e para p63, foi de 53,3% (24 casos). No entanto, foram encontrados alguns casos discordantes entre TP e ML, predominantemente para p63 (46,7%, correspondendo a 21 casos). A Tabela 14 demonstra os padrões de imunexpressão concordantes ou discordantes encontrados nas amostras pareadas. Apesar da diferença, nenhuma associação estatisticamente significativa foi observada entre as duas proteínas estudadas ( $P=0,079$ ).

Tabela 14 – Resultados dos padrões de imunexpressão dos tumores primários comparados com suas respectivas metástases linfonodais, demonstrando a concordância ou discordância nos 45 pacientes avaliados (%).

TUMOR PRIMÁRIO x METÁSTASE LINFONODAL		p53	p63
		N ‡	N
CONCORDÂNCIA			
-	-	19 (42,2)	10 (22,2)
+	+	14 (31,1)	14 (31,1)
DISCORDÂNCIA			
-	+	9 (20)	12 (26,7)
+	-	3 (6,7)	9 (20)
<b>TOTAL</b>		<b>45 (100)</b>	<b>45 (100)</b>

‡ Número de pacientes avaliados.

A taxa de SG em cinco anos foi de 21,5% (desvio padrão de 8,6%), com média de 20 meses. Por outro lado, a SLD em dois anos foi de 20% (desvio padrão de 9,1%), com média de 10 meses.

Os pacientes positivos para p63 nas ML tiveram significativamente melhores índices de SG e SLD (P=0,049 e P=0,006, respectivamente). Os tumores negativos para p63 tiveram as menores taxas de SG e SLD, conforme demonstrado nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

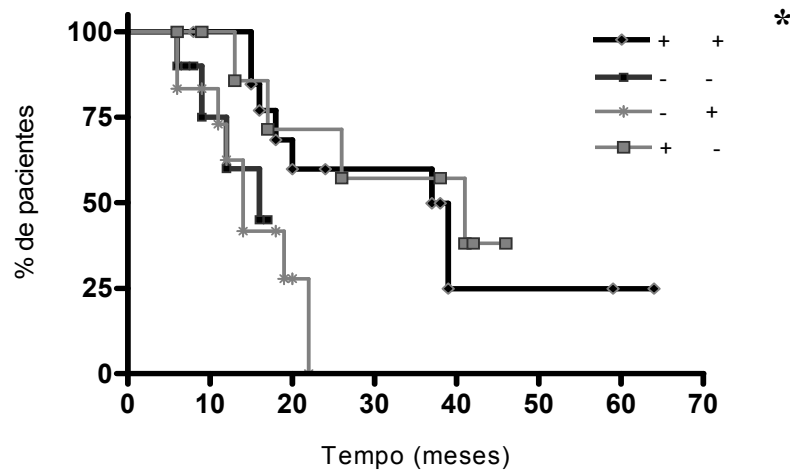


Figura 17 – Comparação das curvas da sobrevivência global nos pacientes estudados conforme o padrão de imunopositividade de p63 no tumor primário e em sua respectiva metástase linfonodal.

\* + + = Positivo em ambas amostras, - - = Negativo em ambas amostras,  
- + = Positivo na amostra complementar, + - = Positivo no tumor primário.

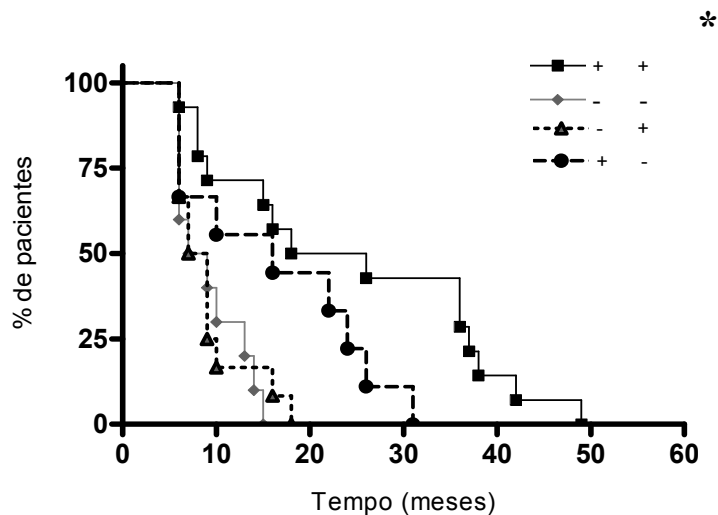


Figura 18 – Comparação das curvas da sobrevivência livre da doença nos pacientes estudados conforme o padrão de imunopositividade de p63 no tumor primário e em sua respectiva metástase linfonodal.

\* + + = Positivo em ambas amostras, - - = Negativo em ambas amostras,  
- + = Positivo na amostra complementar, + - = Positivo no tumor primário.

Analisando as curvas de sobrevida conforme a imunoposição de p53, foi encontrada diferença significativa entre as curvas de SLD para os pacientes positivos ( $\geq 10\%$ ) ou negativos ( $< 10\%$ ), sendo mais favoráveis para os tumores negativos nas ML, com  $P=0,009$ , conforme demonstrado na Figura 19. No entanto, em relação a SG, não foram encontradas diferenças significativas, com  $P=0,129$ , conforme demonstrado na Figura 20.

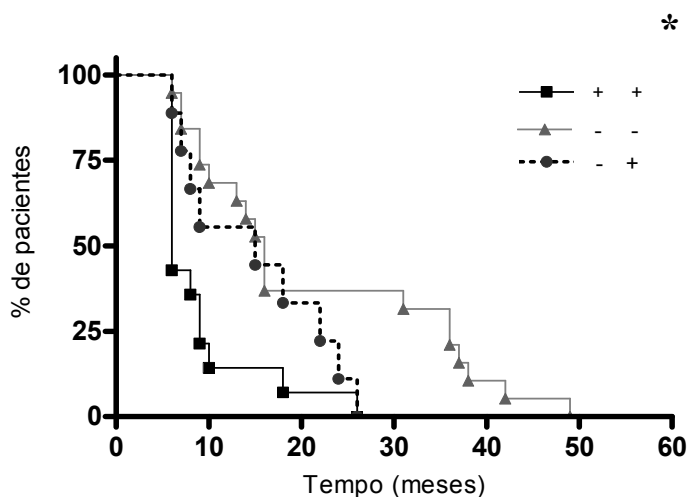


Figura 19 – Comparação das curvas da sobrevida livre da doença nos pacientes estudados conforme o padrão de imunoposição de p53 no tumor primário e em sua respectiva metástase linfonodal.

\* + + = Positivo em ambas amostras, - - = Negativo em ambas amostras,  
- + = Positivo na amostra complementar, + - = Positivo no tumor primário.

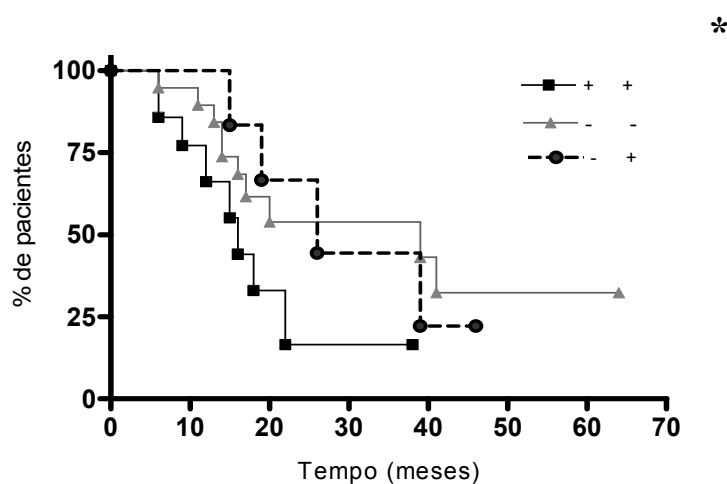


Figura 20 – Comparação das curvas da sobrevida global nos pacientes estudados conforme o padrão de imunoposição de p53 no tumor primário e em sua respectiva metástase linfonodal.

\* + + = Positivo em ambas amostras, - - = Negativo em ambas amostras,  
- + = Positivo na amostra complementar, + - = Positivo no tumor primário.

#### 5.4. Detecção do HPV no carcinoma epidermóide oral

De maneira semelhante ao estudo anterior, foram selecionadas duas amostras pareadas para cada paciente selecionado para este trabalho. Portanto, dos 87 pacientes selecionados para este estudo, foram selecionadas 174 amostras de CEO, incluindo 87 TP como amostras iniciais, além de 49 casos de recidivas, 28 metástases cervicais linfonodais e 10 casos de tumores irresssecáveis em que foram selecionadas amostras tumorais de necropsias como AP. Na amplificação com os *primers* PC03 e PC04, utilizados como controle interno da reação para detecção do gene da beta-globina, o DNA amplificado foi encontrado em todas as 174 amostras estudadas. As informações clinicopatológicas dos pacientes selecionados para este estudo estão sumarizadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Características clinicopatológicas dos pacientes com carcinoma epidermóide oral selecionados para o estudo de detecção do HPV.

	LOCALIZAÇÃO TUMORAL PRIMÁRIA					TOTAL
	Assoalho	Língua	Palato duro	Lábio inf.	Outras*	
<b>CASOS</b>	26 (29,9)	22 (25,3)	17 (19,5)	13 (14,9)	9 (10,4)	<b>87 (100)</b>
<b>Idade</b>						
≤ 60 anos	21 (80,8)	13 (59,1)	10 (58,8)	6 (46,2)	4 (44,4)	<b>54 (62,1)</b>
> 60 anos	5 (40,9)	9 (40,9)	7 (41,2)	7 (53,8)	5 (55,6)	<b>33 (37,9)</b>
<b>Gênero</b>						
masculino	24 (92,3)	16 (72,7)	15 (88,2)	11 (84,6)	7 (77,8)	<b>73 (83,9)</b>
feminino	2 (7,7)	6 (27,3)	2 (11,8)	2 (15,4)	2 (22,2)	<b>14 (16,1)</b>
<b>Recidiva</b>						
não	13 (50)	8 (36,4)	8 (47,1)	7 (53,9)	4 (44,4)	<b>40 (46)</b>
sim	13 (50)	14 (63,6)	9 (52,9)	6 (46,1)	5 (55,6)	<b>47 (54)</b>
<b>Metástase</b>						
não	14 (53,9)	15 (68,2)	10 (58,8)	6 (46,1)	5 (55,6)	<b>50 (57,5)</b>
sim	12 (46,1)	7 (31,8)	7 (41,2)	7 (53,9)	4 (44,4)	<b>37 (42,5)</b>
<b>Óbito</b>						
não	17 (65,4)	11 (50)	11 (64,7)	10 (76,9)	5 (55,6)	<b>54 (62,1)</b>
sim	9 (34,6)	11 (50)	6 (35,3)	3 (23,1)	4 (44,4)	<b>33 (37,9)</b>

\* Outras localizações anatômicas incluem trígono retromolar, mucosa jugal, lábio superior e gengiva.



O controle positivo para o HPV foi amplificado em todas as reações. A amplificação com os *primers* GP5+ e GP6+ mostrou a presença do DNA viral em 18 das 174 (10,4%) amostras de CEO testadas (Figura 21), correspondendo a 17 dos 87 (19,5%) pacientes estudados. Foram 13 pacientes do gênero masculino e quatro do feminino os pacientes com positividade para o DNA do HPV, com uma relação masculino:feminino de 3,25:1. No entanto, o índice total de positividade para os pacientes do gênero masculino foi menor do que no gênero oposto (17,8% vs. 28,6%). As idades encontradas nos pacientes deste estudo variaram de 46 a 90 anos, com média de 59 anos (Tabela 16).

Tabela 16 – Características clinicopatológicas dos 17 pacientes diagnosticados com carcinoma epidermóide oral e com positividade para o DNA do HPV.

Nº	Idade	Gênero	Consumo de Tabaco	TP	AC	Diferenciação	
						TP	AC
1	60	F	nega	língua <sup>A</sup>	recidiva <sup>A</sup>	B	M
2	54	M	confirma	língua <sup>C</sup>	recidiva <sup>N</sup>	B	B
3	60	M	confirma	língua <sup>C</sup>	recidiva <sup>N</sup>	B	B
4	61	F	nega	língua <sup>B</sup>	recidiva <sup>N</sup>	M	B
5	90	F	nega	língua <sup>B</sup>	recidiva <sup>N</sup>	B	B
6	53	M	confirma	assoalho <sup>N</sup>	recidiva <sup>A</sup>	B	B
7	53	M	nega	assoalho <sup>C</sup>	recidiva <sup>N</sup>	M	M
8	57	M	confirma	assoalho <sup>N</sup>	metastase <sup>D</sup>	B	B
9	46	M	confirma	assoalho <sup>N</sup>	metastase <sup>C</sup>	B	B
10	62	M	confirma	lábio inferior <sup>C</sup>	recidiva <sup>N</sup>	B	B
11	71	M	confirma	lábio inferior <sup>N</sup>	metastase <sup>D</sup>	B	B
12	71	F	nega	lábio inferior <sup>N</sup>	recidiva <sup>A</sup>	M	P
13	59	M	nega	palato duro <sup>D</sup>	recidiva <sup>N</sup>	M	M
14	57	M	confirma	palato duro <sup>D</sup>	recidiva <sup>N</sup>	B	M
15	47	M	nega	palato duro <sup>C</sup>	metastase <sup>N</sup>	B	M
16	50	M	confirma	palato duro <sup>N</sup>	recidiva <sup>B</sup>	B	M
17	53	M	confirma	retromolar <sup>N</sup>	necrópsia <sup>D</sup>	P	P

M = masculino; F = feminino; TP = tumor primário; AC = amostra complementar; <sup>A</sup> = positivo para HPV-16; <sup>B</sup> = positivo para HPV-18; <sup>C</sup> = positivo para ambos; <sup>D</sup> = subtipo de HPV não identificado; <sup>N</sup> = DNA viral ausente; diferenciação histológica: B = bem, M = moderada, P = pobre.

Com relação ao gênero dos pacientes com tumores portadores do DNA do HPV, foram encontradas cinco amostras positivas correspondentes a quatro pacientes do gênero feminino,

porque uma paciente teve suas duas amostras avaliadas com positividade para o DNA viral (TP e AP). Além disso, quatro das cinco amostras HPV positivas do gênero feminino foram detectadas na língua (Tabela 16). No entanto, nenhuma diferença significativa foi encontrada ao analisar a presença do DNA do HPV conforme o gênero, com  $P=0,460$  (Figura 22), assim como também em relação a idade  $P=0,418$ , como demonstrado na Figura 23. Na classificação histológica dos tumores, a maioria das amostras positivas para o DNA do HPV foram bem diferenciadas (11 amostras – 61,1%). Contudo, nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada, com  $P=0,296$ , conforme demonstrado na Tabela 17.

Tabela 17 – Distribuição dos pacientes com carcinoma epidermóide oral avaliados conforme o grau de diferenciação histológico e a presença do DNA do HPV (%).

	HPV -	HPV +	Total
<b>Diferenciação histológica</b>			
bem	75 (48,1)	12 (66,7)	87 (50)
moderada	62 (39,7)	4 (22,2)	66 (37,9)
pobre	19 (12,2)	2 (11,1)	21 (12,1)
<b>Total</b>	<b>156 (100)</b>	<b>18 (100)</b>	<b>174 (100)</b>

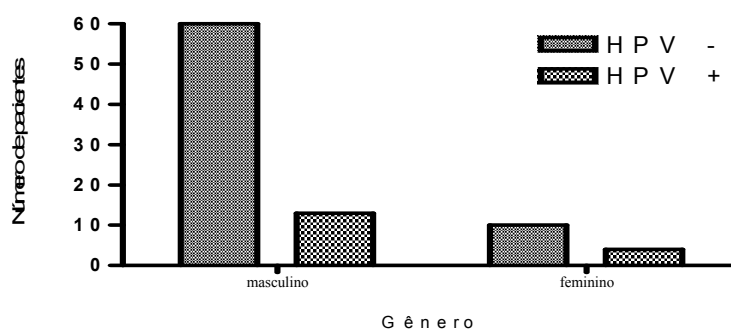


Figura 22 – Distribuição dos pacientes com carcinoma epidermóide oral avaliados conforme o gênero e a presença do DNA do HPV.

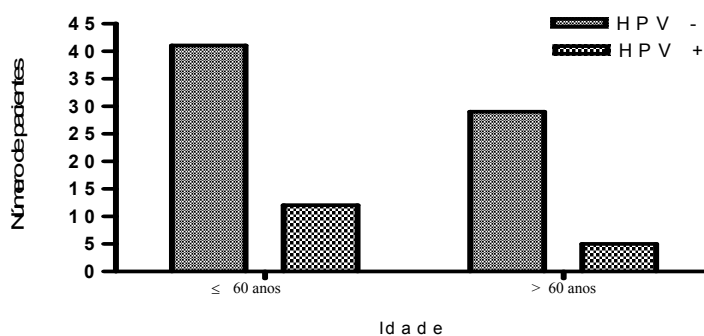


Figura 23 – Distribuição dos pacientes com carcinoma epidermóide oral avaliados conforme a idade e a presença do DNA do HPV.

Em relação ao consumo de tabaco, uma quantidade significativamente maior de amostras positivas para o DNA viral foi encontrada nos pacientes não fumantes ( $P=0,013$ ), como demonstrado na Tabela 18.

Tabela 18 – Presença do DNA do HPV nos pacientes com carcinoma epidermóide oral conforme o consumo de tabaco (%).

Hábito	Presença do DNA do HPV		Total
	HPV -	HPV +	
fumantes	61 (87,1)	10 (58,8)	71 (81,6)
não fumantes	9 (12,9)	7 (41,2)	16 (18,4)
<b>Total</b>	70 (100)	17 (100)	87 (100)

De todas as 87 amostras de TP analisadas, foram encontradas 10 (11,5%) com positividade para o DNA do HPV. Nas 87 AP investigadas, a presença do DNA viral foi observada em 8 (9,2%) amostras tumorais estudadas, consistindo em 4 (4,6%) recidivas, 3 (3,5%) metástases linfonodais cervicais e 1 (1,1%) necropsia. A língua foi a localização

anatômica mais comumente encontrada com HPV, seguida do palato duro, com 6 (33,3%) e 4 (22,2%) das 18 amostras positivas, respectivamente. O assoalho oral demonstrou a presença viral em 3 AP, consistindo 2 delas em metástases cervicais.

A presença dos subtipos HPV-16 e 18 foi detectada respectivamente em 4 (22,2%) e 3 (16,7%) das 18 amostras de CEO positivas para o DNA do HPV (Figura 24), e em 6 (33,3%) amostras investigadas foram encontrados ambos os subtipos virais. O subtipo de HPV não foi identificado em 5 (27,8%) amostras estudadas (Tabela 16).

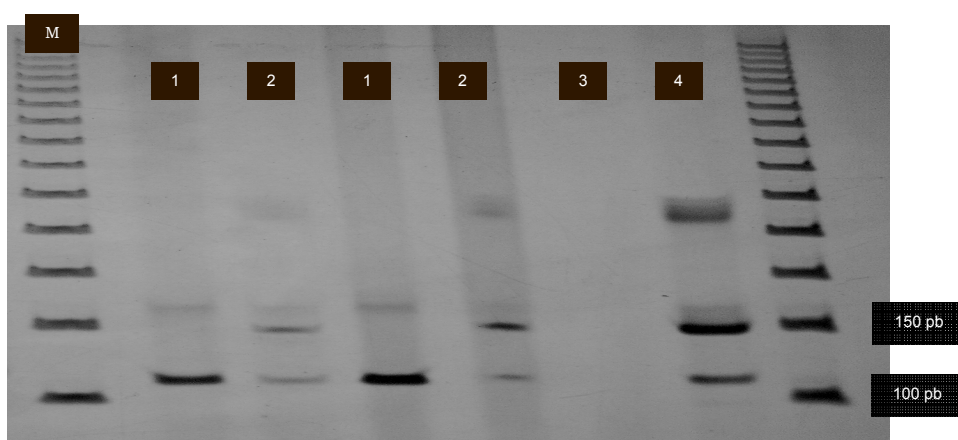


Figura 21 – Mobilidade eletroforética dos produtos amplificados do gene da beta-globina e da região L1 do DNA genômico do HPV, em gel de poli-acrilamida não-desnaturante a 8%.

1 – Amostra positiva para o gene da beta-globina e negativa para o HPV; 2 – Amostra positiva para o gene da beta-globina e para o HPV; 3 – Controle negativo da reação; 4 – Controle positivo da reação (*Siha + HeLa*, 1:10); M – Marcador de 50 pb.

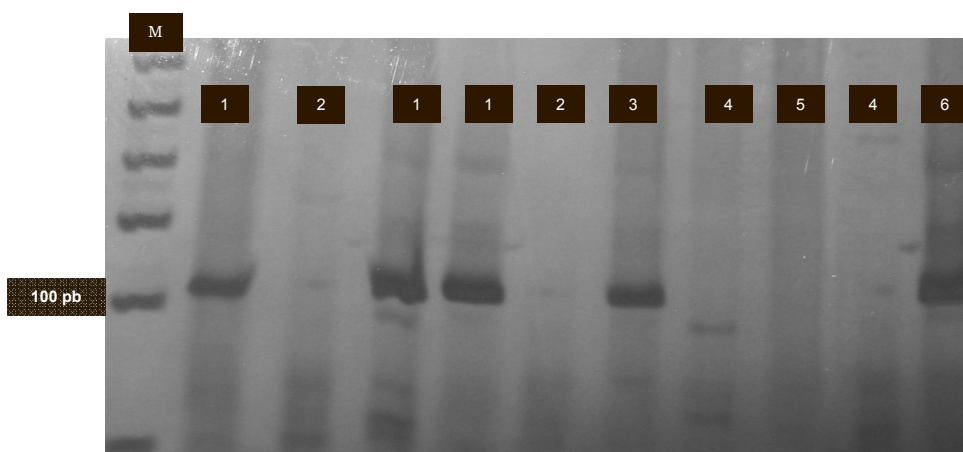


Figura 24 – Mobilidade eletroforética da amplificação do gene E7 para detecção dos subtipos do HPV, em gel de poli-acrilamida não-desnaturante a 8%.

M – Marcador de 50 pb; 1 – Amostra positiva para o gene E7 do HPV-16; 2 – Amostra negativa para o gene E7 do HPV-16; 3 – Amostra positiva para o gene E7 do HPV-18; 4 – Amostra negativa para o gene E7 do HPV-18; 5 – Controle negativo da reação; 6 – Controle positivo da reação (*Siha* ou *HeLa*, 1:10).

O período de SG dos pacientes selecionados para este estudo variou de seis a 118 meses, com um tempo médio de SG de 38 meses e uma SG em cinco anos de 28,6% dos pacientes. O tempo de SLD médio encontrado foi de 13 meses e a SLD em dois anos foi de 29% dos pacientes, em um período que variou de seis a 90 meses. As ocorrências de óbitos foram encontradas em 33 (37,9%) pacientes, sendo nove com positividade para o DNA do HPV e 24 com negatividade. Os pacientes negativos para o DNA do HPV tiveram uma SG média de 37 meses e uma SG em cinco anos de 29,9% dos pacientes. Por outro lado, nos pacientes positivos para o DNA do HPV, a SG média foi de 35 meses e a SG em cinco anos foi de 28,5%. Apesar do melhor tempo de SG e SLD dos pacientes com CEO sem a presença do DNA do HPV, não foram encontradas diferenças significativas através das comparações das curvas de sobrevida entre os dois grupos de pacientes (SG –  $P=0,859$  e SLD –  $P=0,254$ ). Por este motivo, esta variável foi excluída do teste da análise multivariada destes 87 pacientes (ver adiante, Tabela 19). As curvas de SG e SLD entre os dois grupos são apresentadas nas Figuras 25 e 26, respectivamente.

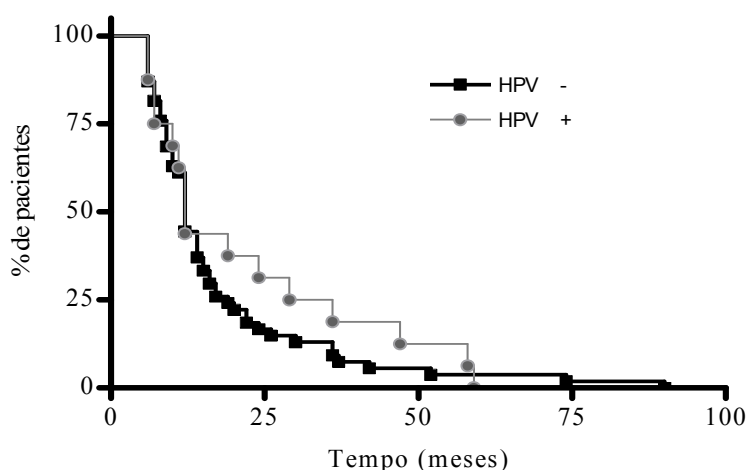


Figura 25 – Sobrevida livre da doença dos pacientes com carcinoma epidermóide oral avaliados conforme a presença ou ausência do DNA do HPV.

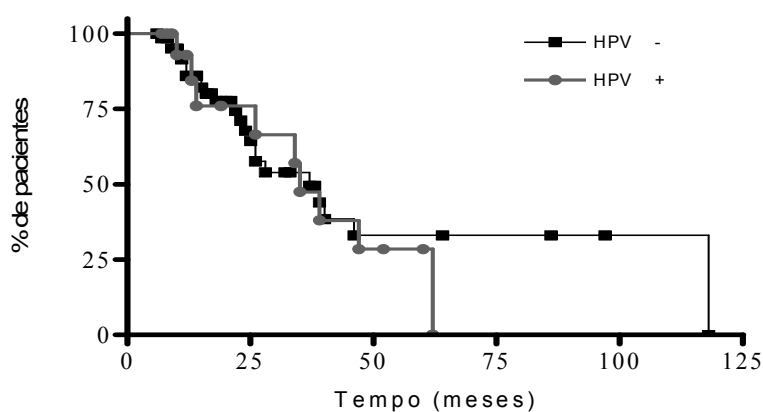


Figura 26 – Sobrevida global dos pacientes com carcinoma epidermóide oral avaliados conforme a presença ou ausência do DNA do HPV.

### 5.5. Análise multivariada dos fatores clinicopatológicos e moleculares associados ao prognóstico dos pacientes com carcinoma epidermóide oral

Na análise multivariada (regressão de Cox), as variáveis independentes com diferenças estatisticamente significativas relacionadas ao prognóstico da doença foram a idade [OR=3,9 (95% IC – 0,37-4,2) P=0,0001], a localização anatômica tumoral (P=0,0037) e a expressão da proteína p53 [OR=2,91 (95% IC – 1,18-7,19) P=0,0023], conforme demonstrado na Tabela 19. A análise da presença do DNA do HPV com as curvas de sobrevida não foi incluída na análise multivariada por ter apresentado resultado não significativo na análise univariada prévia.

Tabela 19 – Sobrevida global acumulada nos 87 pacientes com carcinoma epidermóide oral conforme as variáveis investigadas.

Variáveis	Categoria	Casos	Sobrevida Global em 5 anos (%)	Valor de P* <sup>A</sup>
Idade	≤ 60	54	40,8	0,0001
	> 60	33	9,1	
Gênero	masculino	73	23,7	0,0516
	feminino	14	31,5	
Localização anatômica	língua	22	16,1	0,0037
	assoalho	26	13,5	
	palato	17	26,7	
	lábio inferior	13	39,4	
	outras <sup>†</sup>	9	35,5	
História pregressa	≤ 3 meses	21	28,7	0,8552
	> 3 ≤ 6 meses	32	25,5	
	> 6 ≤ 9 meses	17	29,4	
	> 9 meses	17	26,4	
Consumo de tabaco	sim	71	26,9	0,7873
	não	16	32,7	
Consumo de álcool	sim	66	22,9	0,8142
	não	21	29,7	
Trauma crônico	presente	15	27,6	0,9977
	ausente	72	26,8	
Diferenciação histológica	bem	47	19,7	0,2983
	moderada	31	25,9	
	pouco	9	22,1	
Recidiva	sim	47	22,8	0,4853
	não	40	30,5	
Metástase	sim	37	22,9	0,7152
	não	50	29,7	
Tratamento	cirurgia	17	24,5	0,7064
	cirurgia e RT	43	30,9	
	cirurgia, RT e QT	18	21,2	
	RT	1	-	
	RT e QT	8	22,5	
p53	positivo	44	13,8	0,0023
	negativo	43	37,9	
p63	positivo	56	28,5	0,2080
	negativo	31	25,3	

\* Resultados significativos com  $P < 0,05$ . <sup>A</sup> Teste Log-rank. <sup>†</sup> Outras localizações anatômicas incluem mucosa retromolar e jugal, gengiva e lábio superior. RT= Radioterapia, QT= Quimioterapia.

## 6. DISCUSSÃO

O CEO é uma doença de características heterogêneas, com padrões distintos de apresentação e de comportamento biológico. Por estes motivos, ainda não foi esclarecido porque alguns pacientes com o mesmo estadiamento tumoral e localização anatômica primária evoluem melhor do que outros.

Alguns fatores precisam ser considerados ao analisar os resultados deste trabalho. Os dados pertencem a uma população específica em tratamento no HC/FMRP-USP, que constitui um centro de referência terciária regional, sendo a maioria dos pacientes proveniente de fora de Ribeirão Preto (COSTA, 2005). Além disso, por se tratar de um estudo retrospectivo, o mesmo fica sujeito a limitações relacionadas ao registro, conteúdo e disponibilidade das informações nos prontuários médicos. Entretanto, os resultados obtidos acompanham a tendência de outros estudos nacionais, onde Pithan et al. (2004) encontraram 400 casos em 26 anos de estudo e Souza et al. (1996) estudaram 654 casos num período de 22 anos. Em um outro estudo retrospectivo de 11 anos, foram descritos 740 casos (GERVASIO et al., 2001). No entanto, estes estudos incluem também algumas lesões em orofaringe, como palato mole e base de língua, distorcendo um pouco o perfil dos pacientes com lesões exclusivas em boca.

A distribuição dos pacientes conforme a idade foi concordante com outros trabalhos da literatura, com um pico de incidência na 6ª década de vida (OLIVER et al., 1996; SOUZA et al., 1996; COSTA, 2005). Embora alguns estudos indiquem um aumento da prevalência do CEO em adultos jovens (IYPE et al., 2001; LLEWELLYN et al., 2001), a incidência encontrada em nosso trabalho não foi tão alta, sendo semelhante ao estudo de Martin-Granizo et al. (1997).

O fator geográfico é influenciado pelo meio ambiente e pela condição sócio-econômica, que refletem os hábitos e influenciam na prevalência da neoplasia nos indivíduos



de determinada região. O gênero masculino é provavelmente mais acometido no CEO pela maior exposição aos conhecidos agentes carcinogênicos associados a este tipo de doença, confirmando os achados de Costa (2005). Contudo, apesar da estimativa de que a prevalência tenderia à igualdade entre os gêneros devido ao aumento do consumo de tabaco entre as mulheres (CHARABI et al., 2000), observa-se que a neoplasia continua afetando predominantemente pacientes do gênero masculino. A relação de distribuição encontrada entre os gêneros foi de 4,6:1 (masculino:feminino), sendo maior do que a observada em outros estudos nacionais (SOUZA et al., 1996; CARVALHO et al., 2001; GERVASIO et al., 2001; PITHAN et al., 2004). Quanto à interação entre gênero, idade e prevalência da neoplasia, são nítidas as alterações antes e após os 60 anos, de 6:3 para 2,8:1, respectivamente. Esta interação também foi confirmada por outros autores (HOROWITZ et al., 1996; CARVALHO et al., 2001; PERUSSI et al., 2002), indicando um nítido aumento na prevalência da doença para o gênero feminino após os 60 anos, sugerindo que, além das diferenças na expectativa de vida, as mulheres expõem-se em menor quantidade ou mais tardiamente aos fatores de risco da doença. Portanto, na população estudada, confirmando os achados de Costa (2005), ainda é o homem quem mais se expõe aos fatores de risco, sendo a mulher mais preservada destas influências e com menor prevalência de CEO.

A combinação do tabagismo com o etilismo é confirmada como o principal fator de risco para o desenvolvimento do CEO (TALAMINI et al., 1990), e foi relacionada por Rothman (1980) a um risco 15 vezes maior de se adquirir a doença. Em estudo anterior realizado na população brasileira, o uso exclusivo do tabaco nos pacientes estudados foi superior ao encontrado pelo nosso (31,9% vs 21,7%) (GERVASIO et al., 2001). Da mesma forma, em nossa casuística, 56,6% dos pacientes relataram a combinação de tabaco e álcool, dados um pouco inferiores aos encontrados por Gervasio et al. (2001) (63,8%). Apesar destes dois fatores de risco estarem também associados ao prognóstico da doença (MANSOUR et

al., 2003), assim como no estudo de Kerdpon e Sriplung (2001), não encontramos influência significativa destes hábitos na ocorrência das recidivas e metástases.

Estudos epidemiológicos mostram alta variabilidade entre as regiões anatômicas acometidas por este tipo de carcinoma. A língua, o assoalho oral e o lábio inferior são as localizações mais comumente relatadas (OLIVER et al., 1996; GERVASIO et al., 2001; DEDIVITIS et al., 2004). Este estudo mostra concordância com a literatura (DEDIVITIS et al., 2004; PITHAN et al., 2004, COSTA, 2005), sendo a língua a topografia mais freqüente, com 28,8% dos casos de CEO.

Alguns trabalhos demonstram o lábio inferior como a região anatômica mais afetada por este tipo de carcinoma, sobretudo em países como Grécia, Nova Zelândia e Austrália (ANTONIADES et al., 1995; COX et al., 1995; SUGERMAN et al., 2002). Segundo Dedivitis et al. (2004), o carcinoma labial tem um comportamento biológico diferente do intra-oral, assemelhando-se mais ao carcinoma epidermóide da pele exposta ao sol. No entanto, apesar de alguns estudos excluírem o CEO em lábio inferior (OLIVER et al., 1996; DEDIVITIS et al., 2004), esta localização é classificada pela UICC como uma neoplasia oral (ORD, 1996). Nosso estudo detectou 16,5% dos pacientes com este tipo de carcinoma, maior do que a quantidade encontrada por outros estudos realizados em nosso país, que foram de 14,7% (MOREIRA et al., 1997) e 9,7% (PITHAN et al., 2004). Dos pacientes encontrados com lesões tumorais labiais, 72,9% confirmaram a exposição actínica desprotegida. O fato de ser um país tropical e uma região com indivíduos que exercem atividades rurais expostos à radiação ultravioleta sem proteção adequada pode explicar esta prevalência, que pode também estar subestimada, devido ao fato de que boa parte destas neoplasias, sobretudo em fases mais precoces, pode ser encaminhada a cirurgões plásticos. Embora este tumor seja tipicamente diagnosticado e tratado no estágio inicial, a negligência do paciente em procurar tratamento pode resultar em prognósticos desfavoráveis.

Apesar de ser um tema controverso na literatura, a irritação crônica é considerada por alguns autores como um fator carcinogênico promotor do CEO (SCIUBBA, 2001). Pérez et al. (2005) demonstraram experimentalmente que úlceras orais traumáticas crônicas podem atuar na promoção tumoral das regiões com alterações genéticas tumorais já iniciadas. Na cavidade oral, carcinógenos como tabaco e álcool podem desencadear a iniciação tumoral sobre extensas áreas, contribuindo para o fenômeno de cancerização em campo (SLAUGHTER et al., 1953). Foi observada diferença significativa nos relatos de trauma entre as regiões anatômicas analisadas no presente estudo, sendo o palato duro a região mais relacionada.

O diagnóstico precoce do CEO tem um papel fundamental em seu prognóstico, porém, infelizmente, a taxa de crescimento tumoral costuma ser mais rápida do que a evolução de seus sintomas (WILDT et al., 1995). Apesar de serem escassos os estudos associando o perfil dos pacientes conforme o tempo de evolução das lesões, é consenso na literatura que os pacientes diagnosticados em estágio tardio da doença têm maiores índices de mortalidade (OLIVER et al., 1996). Por outro lado, se a neoplasia for detectada precocemente e o tratamento for imediato, o paciente tem cerca de 85% de chance de cura (CARVALHO, 2003), desde que controlados os fatores de risco. De acordo com Kowalski e Souza (2001), as causas mais importantes do atraso no diagnóstico são a evolução inicial oligosintomática, o reduzido conhecimento sobre a doença entre pacientes e profissionais, o medo do paciente em relação ao diagnóstico e as dificuldades ao acesso médico. O tempo médio que os pacientes demoram a procurar cuidados profissionais varia de três a cinco meses para o CEO (WILDT et al., 1995), menor do que o tempo médio encontrado em nosso estudo, que foi de 13 meses, influenciado principalmente pela demora no diagnóstico das lesões labiais. Por este motivo, foi encontrada correlação significativa entre este tempo e a topografia da lesão, sendo as lesões labiais diagnosticadas mais tardiamente do que as outras regiões. Segundo Antunes e

Antunes (2004), os lábios são freqüentemente acometidos por enfermidades como herpes, úlceras simples, fissuras e granulomas. Tal fato sugere que, possivelmente, a alta freqüência de lesões benignas possa levar o paciente a postergar a procura profissional. Por outro lado, assim como Wildt et al. (1995), não encontramos significância estatística entre a história prévia da doença conforme os gêneros e o tempo de sobrevida do paciente.

A maioria das metástases linfáticas do CEO é encontrada na região cervical, sendo considerado por vários autores como o mais significativo fator prognóstico da doença (OKADA et al., 2003; SHAH et al., 1990). De acordo com isso, os pacientes sem recidivas e metástases em nosso estudo tiveram uma sobrevida maior do que aqueles que apresentaram recidivas, metástases ou ambos.

Segundo Jones et al. (1994), o risco de ocorrência de recidivas ou de um segundo tumor primário varia entre 4,3-30% e a incidência de metástases linfonodais cervicais relatada na literatura varia de 35,3-60% (NAKAYAMA et al., 1999; WOOLGAR, 1999; OKADA et al., 2003). A incidência de recidivas encontrada em nosso trabalho (30%) diferiu pouco da literatura. Entretanto, a ocorrência de metástases linfonodais (28,8%) mostrou-se inferior a outros estudos, exceto quando comparado aos resultados de Oliver et al. (1996), que encontraram apenas 18,5% dos casos com metástases linfonodais cervicais. A principal discrepância encontrada foi para os casos de língua, que tiveram apenas 25,4% de metástases linfonodais, sendo a incidência relatada na literatura de 37-55% (SHINTANI et al., 1997; WOOLGAR, 1999). Esta variação pode ser decorrente dos critérios de seleção aplicados em outros estudos, onde muitos incluem também as lesões em base de língua, que são detectadas mais tardiamente pela sua localização de difícil acesso e tendem a disseminar suas metástases devido ao atraso de seu diagnóstico.

Como a maioria dos prontuários estudados era desprovida de informações sobre o estadiamento tumoral, selecionamos os pacientes em um grupo mais homogêneo para a

realização do estudo da sobrevida. Desta forma, para se evitar a influência das diferentes estratégias terapêuticas e assegurar maior homogeneidade amostral na avaliação do prognóstico dos pacientes estudados, fez-se importante a seleção dos tumores primários desprovidos de lesões multicêntricas e de comprometimento metastático linfonodal. Pelo mesmo motivo, também foram excluídos os tumores classificados como T4. Além disso, foi necessária também a realização de uma criteriosa seleção da localização anatômica tumoral primária, sendo selecionadas para o presente estudo somente as lesões orais. Segundo Ha e Califano (2004), os diversos estudos prognósticos que agrupam tumores orofaríngeos no estudo do prognóstico do CEO refletem a dificuldade de separação entre os locais onde ocorrem os tumores, uma vez que entre a cavidade oral e a orofaringe não existe limite preciso para classificação anatômica da doença, além do difícil acesso. Entretanto, estes tumores podem apresentar um comportamento biológico específico, com diferentes respostas à radioterapia, assim como outras características clínicas e prognósticas que podem diferir do CEO (HA; CALIFANO, 2004).

A padronização da idade para caracterização da população idosa não é consenso na literatura, no entanto, apesar de vários autores optarem por valores mais amplos, foi utilizado o critério da OMS que indica a idade de 60 anos como início da 3ª idade nos países em desenvolvimento (SARINI et al., 2001). Ao contrário de Perussi et al. (2002), foi encontrado um comportamento diferente entre os grupos de idade, demonstrando diferenças significativas nas curvas de sobrevida, sugerindo que a diminuição da sobrevivência nos pacientes mais idosos pode ocorrer devido a maior incidência de doenças debilitantes ou comorbidades, maiores seqüelas pós-tratamento e complicações associadas ao processo fisiológico de envelhecimento.

A análise do CEO como um grupo pode ocultar importantes diferenças de sobrevida nos sítios anatômicos tumorais específicos. A investigação do perfil e da sobrevida dos

pacientes conforme as regiões anatômicas específicas orientam campanhas de prevenção educativas para o diagnóstico precoce e tratamento desta doença, que quase sempre começa num local de fácil visualização para o próprio paciente. Por este motivo, muitos autores consideram os tumores em lábio inferior com um melhor prognóstico quando comparados aos que acometem língua e assoalho, também devido a freqüente presença de metástases linfonodais cervicais nestes últimos (BELTRAMI et al., 1992). Em um trabalho com critérios semelhantes aos nossos, as taxas observadas de SG em cinco anos foram de 90% para os carcinomas de lábio inferior, 60% para os diagnosticados em língua anterior e 40% para os de assoalho e palato duro (TRALONGO et al., 1999). Apresentando-se bem inferiores, as taxas encontradas em nossa casuística foram de 51% nas neoplasias de lábio inferior, 14% em língua anterior, 35% nas lesões de assoalho e 15% nos tumores de palato. Assim como em outros estudos (FRANCO et al., 1993; WUNSCH-FILHO, 2002), as lesões linguais tiveram as piores taxas de sobrevida. Além disso, apresentaram a maior discrepância com relação à incidência de metástases regionais em comparação com outros trabalhos (WOOLGAR, 1999; CARVALHO et al., 2004). No entanto, não encontramos em nosso estudo variações significativas na sobrevida conforme a localização anatômica primária da lesão.

Considerando todas as localizações anatômicas tumorais, a taxa de SG em cinco anos foi de apenas 24%, próxima à encontrada para os pacientes negros norte-americanos com esta doença (27,6%) (MOORE et al., 2001). Apesar dos pacientes com metástases iniciais não terem sido incluídos no estudo, um dos fatores que podem estar implicados na reduzida taxa de SG encontrada pode ser a ocorrência das micrometástases linfonodais ocultas, que contribuem de maneira significativa para um pior prognóstico do paciente. Segundo Asakage et al. (1998), existe um subgrupo de pequenos tumores primários que se comportam de uma maneira agressiva inesperada. De acordo com Okada et al. (2003), mesmo nas lesões primárias T1 e T2 do CEO, podem ocorrer metástases regionais nos linfonodos, e na literatura

existem diversos estudos evidenciando a ocorrência de gânglios cervicais patologicamente positivos em pacientes sem evidências clínicas da doença (LYDIATT et al., 1993; HICKS et al., 1998). Embora os tumores T3 e T4 apresentem maior probabilidade de ocorrência de metástases linfonodais do que os T1 e T2, segundo Lopes et al. (2002), a capacidade do CEO de metastatizar nem sempre está relacionada ao estadiamento clínico e, de acordo com Bergman et al. (1994), as metástases regionais são detectadas apenas em cerca de 70% dos pacientes através do exame clínico de rotina, sugerindo que estas ocorrências podem estar subestimadas em nossos registros, podendo ter influenciado nas taxas de sobrevida obtidas. Como agravante, Ferlito et al. (2002) ressaltam que mesmo os exames mais modernos e sofisticados de imagem podem não detectar a ocorrência das micrometástases ocultas no CEO.

Um ponto crucial no conhecimento da biologia tumoral é que as células neoplásicas evoluem com o acúmulo de alterações genéticas que propiciam o seu desenvolvimento (FEARON; VOGELSTEIN, 1990; BRAAKHUIS et al., 2002; BRAAKHUIS et al., 2004). Os mecanismos celulares de controle de proliferação, apoptose e estabilidade genômica podem ser alterados pela desregulação de genes específicos, induzindo ao processo neoplásico (DAS; NAGPAL, 2002). Pouco ainda se sabe atualmente sobre as alterações específicas nos genes associados com a progressão do CEO, mas o gene P53 tem sido um dos mais investigados.

Os esforços prévios para correlacionar a imunexpressão da proteína p53 com o prognóstico dos pacientes com CEO têm sido divergentes e inconclusivos. A ambiguidade dos resultados pode ser atribuída a fatores como amostras pequenas e heterogêneas quanto à localização anatômica, origem do tecido neoplásico (embebido em parafina ou congelado), anticorpos utilizados e limiares arbitrários da porcentagem de células com imunomarcção utilizados para a caracterização positiva dos tumores (CARLOS DE VICENTE et al., 2004).

Seguindo outros estudos (SITTEL et al., 1999; GRABENBAUER et al., 2000; CHOI et al., 2002; ZIGEUNER et al., 2004; CARLOS DE VICENTE et al., 2004), foi escolhido um limiar de imunomarcção nuclear de até 10% como limite para a classificação dos tumores negativos para a imunexpressão da proteína p53. A proporção de 52,8% de tumores p53 positivos encontrados em nosso estudo encontra-se dentro da variação obtida por outras investigações prévias de diversos autores, que encontraram entre 34-81% de imunomarcção positiva para p53 (BRACHMAN et al., 1992; AHOMADEGBE et al., 1995).

Apesar da inconsistência dos estudos prévios concernentes ao valor prognóstico da imunexpressão da proteína p53 no CEO, nossos resultados demonstraram diferenças significativas para os pacientes caracterizados como negativos na imunexpressão da proteína p53, sendo que estes pacientes apresentaram maior tempo de SG e tiveram menor ocorrência de metástases. Em um estudo com metodologia semelhante, onde somente foram selecionados casos de CEO com ausência de metástases linfonodais cervicais, também foi verificado que a imunexpressão de p53 apresentou-se com um valor prognóstico significativo, associada a um maior período de sobrevida nos pacientes com tumores p53 negativos (CARLOS DE VICENTE et al., 2004).

Em relação a ocorrência de metástases linfonodais cervicais, nossos resultados estão em concordância com os de outros autores, que também encontraram associação significativa entre este importante fator prognóstico e a imunexpressão da proteína p53 (OSAKI et al., 2000; KHADEMI et al., 2002).

Apesar de nenhuma diferença significativa ter sido encontrada ao analisar as curvas de SLD em nosso estudo, uma tendência de curvas de SLD mais desfavoráveis foi demonstrada para os tumores p53 positivos por Siegelmann-Danieli et al. (2005).



Em concordância com Massion et al. (2003) e Bortoluzzi et al. (2004), nossos resultados não demonstraram correlação entre a imunopressão de p63 e p53, sugerindo funções independentes destas proteínas durante a tumorigênese e progressão do CEO.

Os 106 casos analisados no presente estudo representam uma das maiores casuísticas de CEO investigadas até o momento para a imunopressão da proteína p63. A detecção imunohistoquímica de p63 foi quase sempre evidente nos casos avaliados, e a elevada imunopressão encontrada (87,8%) está em concordância com outros estudos prévios (HAGIWARA et al., 1999; CHOI et al., 2002; NYLANDER et al., 2002; LO MUZIO et al., 2005), suportando a idéia do envolvimento de p63 no processo de tumorigênese do CEO. No entanto, ainda existem poucas publicações avaliando o significado prognóstico da imunopressão de p63 no CEO.

Ainda não existe um consenso para a avaliação imunohistoquímica da proteína p63. Existem algumas investigações demonstrando que a imunopressão da isoforma TAp63 não tem sido detectada pela imunohistoquímica ao se utilizar o anticorpo monoclonal 4A4 comumente empregado (YANG et al., 1998, NYLANDER et al., 2002). Contudo, outros autores sugerem que tal ausência de detecção pode ser devido aos baixos níveis de imunopressão de TAp63, sendo que a maioria dos estudos demonstra a utilização do anticorpo 4A4 para a detecção de ambas isoformas (PARSA et al., 1999; CROOK et al., 2000; PELLEGRINI et al., 2001; FOSCHINI et al., 2004; LO MUZIO et al., 2005; RAMALHO et al., 2006).

Muitos estudos demonstram também alta variabilidade no padrão de contagem da imunopressão de p63. A maioria das investigações somente avalia de maneira quantitativa as células com imunomarcção para p63, sem nenhuma avaliação quanto a intensidade (WANG et al., 2001; CHOI et al., 2002; WEBER et al., 2002; ZIGEUNER et al., 2004; LO MUZIO et al., 2005). No presente estudo, foram avaliados os padrões da quantidade e da

intensidade de imunexpressão da proteína p63. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas na graduação histológica tumoral em relação a ambos os padrões de avaliação, confirmando os resultados também encontrados por Reis-Filho et al. (2002) e Bortoluzzi et al. (2004).

Na avaliação da intensidade de imunexpressão da proteína p63, apesar de nenhuma associação significativa ter sido encontrada em relação a ocorrência de recidivas e metástases, um resultado significativo foi encontrado entre curvas mais favoráveis de SG e forte intensidade de imunexpressão. Os pacientes com tumores que expressaram uma forte intensidade de imunomarcção da proteína p63 apresentaram uma SG em cinco anos de 75,4%. Por outro lado, nenhum dos pacientes com tumores que apresentaram intensidade de imunexpressão fraca ou ausente de p63 não atingiram uma SG em cinco anos. Este fato sugere que a forte intensidade de imunexpressão da proteína p63 pode estar associada a um comportamento tumoral menos agressivo. O único estudo encontrado na literatura que avalia a relação entre o prognóstico e a intensidade de imunexpressão de p63 foi realizado por Massion et al. (2003), que relatou melhor sobrevida nos pacientes com carcinoma epidermóide de pulmão que apresentaram forte intensidade de imunexpressão para a proteína p63.

Na avaliação quantitativa da imunexpressão da proteína p63, existem vários estudos que demonstram a associação entre elevados níveis de imunexpressão com tumores de prognósticos mais favoráveis. Em um estudo realizado com pacientes acometidos por carcinoma epidermóide esofágico, realizado por Takahashi et al. (2006), que estabeleceram o valor mínimo de 50% de positividade de imunexpressão para considerar tumores positivos para p63, a SG em cinco anos foi significativamente maior nos tumores com positividade para p63 (46,4%) do que nos pacientes com tumores negativos (11,1%,  $P=0,05$ ). Do mesmo modo, outros autores encontraram carcinomas de bexiga com baixos níveis de imunexpressão de

p63 associados com prognósticos desfavoráveis (URIST et al., 2002; KOGA et al., 2003). Nossa avaliação quantitativa da imunexpressão de p63 relacionada ao comportamento clínico tumoral está em concordância com Choi et al. (2002), que também não encontraram nenhuma associação significativa entre quantidade de imunexpressão de p63 e prognóstico. Além disso, nenhuma associação significativa foi encontrada no presente estudo entre as ocorrências de recidivas e metástases com a imunexpressão quantitativa da proteína p63, assim como no estudo de Reis-Filho et al. (2002), que analisou carcinomas epidermóides cutâneos. Por outro lado, Lo Muzio et al. (2005) estudaram 95 casos de CEO e encontraram tumores com elevados níveis de imunexpressão da proteína p63 significativamente relacionados com um fenótipo mais agressivo e prognóstico ruim.

Uma hipótese para os diferentes resultados entre a avaliação dos padrões de imunexpressão da proteína p63 e o prognóstico tumoral pode estar relacionada com as diferentes formas de atuação das isoformas de p63 na oncogênese. De acordo com Thurfjell et al. (2005), mas ao contrário do observado no presente trabalho, a imunexpressão da proteína p63 nos tumores epidermóides de cabeça e pescoço pode influenciar a diferenciação das células tumorais. Devido a possibilidade de diferentes isoformas de p63 serem expressas conforme alterações na população de células neoplásicas através do início e progressão tumoral, funções distintas de p63 podem aparecer ou serem inativadas. Portanto, a designação de P63 como um oncogene ou um gene supressor tumoral pode ser problemática, porque as isoformas podem exercer funções distintas e opostas.

A investigação com amostras pareadas demonstrou que a imunexpressão da proteína p63, e mais ainda a da p53, foi mais elevada na metástase linfonodal que no TP. Teoricamente, este resultado já seria esperado, visto que o gene P53 é um conhecido gene supressor tumoral e o aumento de sua imunexpressão sugere alguma atividade anormal ou

defeito funcional no genoma celular, que podem progressivamente aumentar durante a evolução tumoral (KROPVELD et al., 1996; NYLANDER et al., 2000).

Ao comparar a análise imunohistoquímica do TP e sua respectiva metástase linfonodal, foi encontrada uma concordância de 73,3% e 53,3% para a imunopressão das proteínas p53 e p63, respectivamente. As discordâncias de imunopressão entre as amostras pareadas podem ser explicadas pelas possíveis alterações clonais ocorridas nas células tumorais metastáticas.

Apesar de nenhuma diferença significativa ter sido encontrada em relação as alterações nos padrões de imunopressão entre as proteínas p53 e p63 nas amostras pareadas, o alto índice de concordância encontrado para a imunopressão de p53 está de acordo com outros estudos, em que resultado semelhante foi encontrado (BURNS et al., 1994; PELLER et al., 1995; KROPVELD et al., 1996). Por outro lado, a imunopressão de p63 demonstrou maior discordância, levantando a hipótese de que os diferentes resultados podem estar relacionados às diferentes atuações das isoformas de p63 na oncogênese, como também sugerido por outros autores (FOSCHINI et al., 2004; LO MUZIO et al., 2005). Além disso, a alta imunopressão de p63 nos TP também sugere um papel relevante no processo de disseminação metastática, onde por sua vez a imunopressão de p63 foi ainda maior. Portanto, estes resultados sobre o aumento da imunopressão de p63 podem indicar uma possível participação desta proteína e suas respectivas isoformas no processo de progressão e disseminação tumoral.

Em uma das poucas investigações encontradas na literatura sobre o padrão de imunopressão da proteína p53 em amostras pareadas associado ao prognóstico dos pacientes, Ahomadegbe et al. (1995) não encontraram associação significativa entre as curvas de SG em cinco anos. No entanto, os autores analisaram apenas 13 amostras pareadas entre os 65 pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço. Apesar da inconsistência dos estudos

prévios sobre o valor prognóstico da imunexpressão de p53 no CEO, uma importância prognóstica foi demonstrada no presente trabalho. Além de selecionar apenas pacientes com CEO, foram encontradas curvas mais favoráveis de SLD para os tumores p53 negativos. Assim como Siegelmann-Daneli et al. (2005), uma tendência de curvas de SLD mais curtas também foi observada nos tumores p53 positivos. Estes resultados sugerem que os tumores iniciais destituídos da imunexpressão de p53 que assim permanecem durante a evolução da doença, podem progredir através de uma maneira biológica menos agressiva em relação à disseminação linfonodal metastática. Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas entre as curvas de SG.

O padrão da imunexpressão da proteína p63 ainda não foi extensivamente investigado no CEO. Além disso, existem poucas publicações sobre o significado prognóstico da imunexpressão de p63 no CEO, o único estudo encontrado na literatura que avaliou a sobrevida dos pacientes com CEO e a imunexpressão de p63 não foi realizado com amostras pareadas (LO MUZIO et al., 2005). De acordo com Lo Muzio et al. (2005), a ausência de correlação entre a imunexpressão da proteína p63 e o prognóstico de pacientes com CEO em estudos prévios pode explicar-se pelo fato do reduzido número de casos examinados nas investigações realizadas. Nossos resultados com amostras pareadas demonstraram melhores curvas de SLD e SG para os tumores p63 positivos em ambas as amostras, seguidos dos tumores p63 positivos no TP. Ao contrário de Lo Muzio et al. (2005), mas em concordância com outros estudos em outras localizações anatômicas (URIST et al., 2002; KOGA et al., 2003; TAKAHASHI et al., 2006), nossos resultados sugerem um melhor prognóstico para os tumores que mantêm a imunexpressão da proteína p63.

A avaliação da imunexpressão das proteínas p53 e p63 em amostras pareadas de CEO demonstrou um padrão concordante de maneira predominante para a proteína p53. Os achados do presente trabalho sugerem que os tumores inicialmente sem a imunexpressão da

proteína p53, mas com positividade para p63 mantida durante a progressão e disseminação da neoplasia, podem seguir um comportamento biológico menos agressivo de evolução e apresentar curvas de sobrevida mais favoráveis.

Não existe atualmente um marcador imunohistoquímico que possa prever de maneira fidedigna a sobrevida ou a resposta terapêutica dos pacientes com CEO. Entretanto, é importante ressaltar que muitos marcadores moleculares demonstram resultados promissores, direcionando o tratamento desta doença em um futuro próximo para protocolos individualizados baseados em características biológicas tumorais e prognósticos específicos de cada paciente. As técnicas que investigam o perfil tumoral de expressão gênica combinadas com o sistema de estadiamento TNM e com as características clínicas e histopatológicas do CEO podem servir como orientação em testes de potenciais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas drogas contra este tipo de câncer.

Com o advento e aprimoramento das técnicas de biologia molecular, numerosos estudos conduzidos nas últimas duas décadas em diversos países têm investigado a presença do HPV na mucosa oral normal, em lesões pré-malignas e/ou no CEO, demonstrando que é no CEO que os subtipos virais de alto risco do HPV são predominantemente encontrados (MILLER; JOHNSTONE, 2001). Além disso, a hipótese da associação da infecção pelo HPV com o desenvolvimento do processo carcinogênico oral é reforçada pela identificação deste vírus nas células neoplásicas em todos os estágios da progressão tumoral (pré-invasivo, invasivo e metástases linfonodais) e devido a sua integração ao genoma hospedeiro em determinadas neoplasias. No entanto, uma das maiores dificuldades em detectar o HPV no CEO é a presença deste vírus apenas em uma determinada população celular, além do reduzido número de cópias virais detectado nas células infectadas. Por estas razões, segundo Elamin et al. (1998), são requeridos métodos de detecção de alta sensibilidade para sua investigação.

Assim como no estudo de Boy et al. (2006), não foi encontrada na presente investigação uma significativa associação entre a presença do HPV e fatores como localização anatômica tumoral primária e gênero. A tendência da maior prevalência da infecção pelo HPV no CEO nos pacientes do gênero masculino tem sido observada em trabalhos prévios (CRUZ et al., 1996; MILLER; WHITE, 1996), assim como nos pacientes com menos de 60 anos de idade (CRUZ et al., 1996; ZHANG et al., 2004). Ao contrário do presente trabalho, Miller et al. (1994) encontraram maior predomínio da presença do DNA do HPV nos pacientes do gênero masculino (75%). Por outro lado, assim como em nossos resultados, também não relataram haver diferença significativa conforme a idade nos pacientes com tumores infectados. Na população mexicana, Ibieta et al. (2005) encontraram 21 (42%) das 50 amostras analisadas com positividade para o HPV, estando o HPV-16 presente em 14 amostras (66,6%) e o subtipo HPV-18 em nenhuma. Os autores também relataram maior prevalência dos tumores com HPV nos pacientes do gênero masculino, com estágio avançado da doença e que apresentavam tumores bem diferenciados, resultados que não foram observados no presente trabalho.

A discrepância entre os achados da infecção pelo HPV em estudos realizados com amostras obtidas por biópsia, esfregaço ou soluções enxaguatórias orais é atribuída por alguns autores ao fato da ocorrência de infecções latentes pelo HPV, onde este vírus pode persistir na camada basal do epitélio, tornando mais difícil a sua detecção por meio de técnicas que utilizam esfregaço ou soluções enxaguatórias orais (MAITLAND et al., 1987; MILLER; WHITE, 1996). Por outro lado, apesar de proporcionarem a investigação da camada basal epitelial, os tecidos biopsiados são de tamanho limitado, podendo originar resultados falso-negativos devido a natureza focal da infecção pelo HPV, problema que não ocorre com as outras duas técnicas, pois permitem uma amostragem generalizada das células mucosas

exfoliadas da superfície da cavidade oral e demonstram resultados positivos durante a infecção produtiva do HPV (McKAIG et al., 1998).

Ao comparar diferentes estudos conduzidos em diversos países, Hsing et al. (1996) enfatizaram a importância de reconhecer que nem todas as investigações que utilizam a PCR para detecção do HPV possuem o mesmo protocolo, sofrendo influência de variabilidades como os *primers* selecionados, condições de amplificação e diferentes métodos de identificação do subtipo viral. De acordo com Terai e Takagi (2001), para a interpretação dos estudos de detecção do DNA do HPV nas amostras orais, deve-se levar em conta não só método laboratorial utilizado, como também a diversidade da população investigada, além do tamanho e a qualidade das amostras estudadas.

Embora seja a PCR o método de detecção mais sensível para a investigação da presença do HPV, esta técnica é sempre passível de contaminações ambientais ou aquelas causadas por reduzidas quantidades de outros fragmentos já amplificados de DNA. Com isso, muitos estudos que utilizaram a PCR podem ter apresentado resultados falso-positivos e conduzido a interpretações como infecções por múltiplos subtipos virais (SYRJANEN, 1990). Entretanto, ao utilizarem cuidadosos e padronizados métodos de aquisição das amostras e de processamento, Hsing et al. (1996) alcançaram alta concordância interlaboratorial ao compararem dois estudos investigativos da presença do HPV em tumores de colo de útero. Como já advertido por Boy et al. (2006) e padronizado para a metodologia do presente trabalho, a utilização de lâminas descartáveis no micrótomo entre os cortes dos diferentes blocos com as amostras tumorais é uma das medidas mais importantes para a exclusão de uma das possíveis fontes de contaminação, assim como a utilização de salas individuais para manipulação do DNA genômico viral amplificado.

A seleção adequada dos *primers* pode influenciar na detecção do HPV no CEO. Miller e White (1996) relataram que a utilização dos *primers* direcionados a um dos genes E foram



duas a três vezes mais eficientes do que os *primers* que identificam a região L. Segundo os autores, esta diferença pode estar relacionada com a integração do DNA do HPV ao genoma da célula hospedeira, quando os genes virais L1 e L2 podem sofrer ruptura. Por outro lado, Matzow et al. (1998) encontraram reduzida presença do HPV em carcinomas orais e laríngeos (2,6% e 19%, respectivamente), mesmo após a utilização de iniciadores direcionados às regiões L1 (GP5+/GP6+) ou E1 (CPI/CPIIG) do genoma viral, e, conforme observou zur Hausen (2002), são as regiões E2, E4, E5 e L2 as mais comumente deletadas no genoma viral durante sua integração ao DNA da célula hospedeira. A seleção e padronização de *primers* adequados para comparação dos estudos sobre a possível influência do HPV no CEO ainda é uma questão que necessita de maior investigação. No presente trabalho, a utilização dos *primers* universais direcionados para a amplificação da região L1 do genoma viral proporcionou a possibilidade de detecção de uma ampla variedade de subtipos do HPV. Entretanto, uma das limitações do presente estudo foi a impossibilidade de determinar a presença do HPV nas células tumorais ou nas células epiteliais da mucosa oral normal adjacente, assim como o estado de integração viral ao genoma hospedeiro.

Steinberg e Dilorenzo (1996) postularam que as células infectadas pelo HPV podem ser mais susceptíveis aos efeitos de outros agentes carcinogênicos, entre eles, o tabaco e o álcool. Embora outros estudos prévios confirmarem a maior ocorrência dos tumores epidermóides de cabeça e pescoço com positividade para o HPV nos pacientes não fumantes (FOURET et al., 1997; HERRERO et al., 2003), a hipótese de que a infecção viral pode atuar sinergisticamente com a exposição ao tabaco e ao álcool não pode ser excluída. Foi demonstrado que a exposição das linhagens celulares de queratinócitos humanos imortalizados pela infecção com os subtipos HPV-16 ou 18 aos agentes carcinogênicos do tabaco resultou num aumento substancial das alterações genéticas, conduzindo a uma

transformação celular não observada em queratinócitos com ausência da infecção pelo HPV que foram expostos aos mesmos carcinógenos (PARK et al., 1995; SHIN et al., 1996).

A história de exposição ao tabaco avaliada nos pacientes do presente trabalho foi limitada apenas à categorização qualitativa, devido a dependência das informações disponíveis nos prontuários médicos. A importância da influência do consumo de tabaco na etiologia do CEO, com conseqüentes mutações na proteína p53, pode conduzir a maiores dificuldades para uma clara identificação da real contribuição do HPV no processo da carcinogênese oral. Além disso, a pesquisa do HPV tem sido limitada pelas dificuldades inerentes ao cultivo *in vitro* do vírus (McKAIG et al., 1998) e porque ainda não estão disponíveis modelos animais para uma investigação direta da relação entre o HPV e o CEO. Por estes motivos, ainda é imprescindível a realização de pesquisas epidemiológicas e moleculares para avaliações adicionais dos efeitos independentes ou em conjunto entre o consumo de tabaco, a infecção pelo HPV e as alterações na expressão de genes cruciais para o controle tumoral.

A presença simultânea dos conhecidos agentes químicos carcinogênicos orais e da infecção pelo HPV na mucosa oral pode favorecer a transformação maligna. Entretanto, segundo demonstrado por diversos autores, assim como também pelos resultados observados no presente trabalho, a participação do HPV na carcinogênese oral é reduzida em relação ao consumo de tabaco e álcool, porque sua prevalência é bem menor do que os casos de CEO encontrados em pacientes tabagistas e etilistas (MILLER; JOHNSTONE, 2001; SYRJANEN, 2003).

Em alguns trabalhos da literatura, os carcinomas epidermóides de orofaringe com positividade para o HPV podem compreender uma doença com fatores clinicopatológicos, moleculares e prognósticos distintos, não devendo ser incluídos nos estudos das neoplasias orais. Conforme descrição de Gillison (2004), os tumores HPV positivos em orofaringe

possuem características basalóides predominantes, poucas mutações do gene P53, menor associação com pacientes que consomem tabaco e álcool, além de um melhor prognóstico. A predileção do HPV por determinadas áreas anatômicas específicas não queratinizadas da orofaringe foi confirmada por estudos em que o DNA do HPV-16 foi detectado em diferentes proporções em regiões como língua (6%), tonsilas (51%), anel de Waldeyer (60%) e faringe (13%), resultando na identificação de um subgrupo distinto de carcinomas de cabeça e pescoço, particularmente os carcinomas tonsilares, que demonstraram uma forte e consistente associação com os HPVs de alto risco, além de apresentarem também características moleculares indicativas da função oncogênica viral (WILCZYNSKI et al., 1998; GILLISON, 2004).

Devido ao fato da infecção pelo HPV apresentar-se de maneira focal, e dos tumores infectados por este vírus estarem menos associados com a exposição ao tabaco, o conceito de cancerização em campo (SLAUGHTER, 1953; CALIFANO et al., 1996) pode ser menos aplicável nestes casos, e os pacientes com estas neoplasias seriam menos susceptíveis ao desenvolvimento de tumores síncronos ou metasíncronos em outras localizações anatômicas como orofaringe, esôfago, demais áreas da cabeça e do pescoço e pulmões, que poderiam afetar negativamente a sua sobrevivência.

Assim como demonstrado na história da investigação do câncer de colo uterino, o progresso na compreensão do significado da infecção pelo HPV no CEO somente pode ser alcançado através de empenhos multidisciplinares. A literatura científica atual ainda é limitada e controversa para permitir uma constatação definitiva sobre o significado clínico e prognóstico da infecção pelo HPV no CEO. As estimativas da prevalência das infecções latentes, subclínicas e produtivas causadas pelo HPV na mucosa oral normal e no CEO ainda não foram claramente determinadas. Pesquisas adicionais sobre o estado físico viral dentro da célula hospedeira e os níveis de expressão das suas oncoproteínas em amostras de mucosa

oral normal, lesões pré-neoplásicas e CEO poderão agregar maiores conhecimentos sobre uma possível transformação neoplásica causada pelo HPV na mucosa oral normal. Além disso, muitos estudos têm sido limitados por fatores como reduzido número de pacientes, diferentes regiões tumorais anatômicas e metodologia laboratorial utilizada. Por esse motivo, os futuros estudos adicionais que avaliarem a presença do HPV no CEO necessitam, além do maior número amostral, de referências específicas sobre a exata localização anatômica tumoral, assim como a adoção de métodos rigorosos para prevenção de possíveis contaminações nas amostras investigadas pela PCR. A pesquisa epidemiológica também é imprescindível para auxiliar na compreensão da associação entre o HPV e os fatores etiológicos demográficos, assim como das possíveis rotas de transmissão viral. Finalmente, muitas investigações ainda serão necessárias para a obtenção de evidências definitivas sobre o verdadeiro significado prognóstico do HPV no CEO. Por meio destas medidas, uma perspectiva diferente sobre a atual relação do HPV com a mucosa da cavidade oral poderá ser obtida e esclarecida.

A sensibilidade individual aos diversos agentes carcinogênicos que entram em contato com a mucosa oral, assim como a variabilidade genética nos mecanismos que interagem com estes agentes em cada paciente é que determinam a heterogeneidade do CEO, além de também estarem associados ao desenvolvimento e prognóstico tumoral.

## 7. CONCLUSÕES

- O carcinoma epidermóide oral foi diagnosticado predominantemente em pacientes do gênero masculino tabagistas e etilistas, durante a 6ª década de vida, tendo como localizações anatômicas primárias a língua e o assoalho oral. Foi encontrada uma alta proporção de tumores em lábio inferior, que demonstraram maior tempo de evolução até o diagnóstico e a exposição actínica desprotegida como o principal fator de risco.
- As piores curvas de sobrevida foram encontradas em pacientes maiores de 60 anos acometidos pelo CEO, assim como também nos pacientes com tumores primários em língua.
- Os tumores que apresentaram metástases linfonodais cervicais demonstraram-se significativamente associados com a imunexpressão da proteína p53.
- A imunexpressão da proteína p53 e a baixa intensidade da imunexpressão da proteína p63 apresentaram associação com os tumores de pior prognóstico.
- No estudo imunohistoquímico com amostras pareadas, os resultados sugerem que, os pacientes com tumores inicialmente p53 negativos e p63 positivos, que mantêm este padrão de imunexpressão na metástase linfonodal, podem seguir um curso biológico menos agressivo, apresentando melhores taxas de sobrevida.
- Na avaliação da presença do HPV nos pacientes com CEO, os poucos casos detectados sugerem que o HPV não possui a mesma influência etiológica que o consumo de tabaco nos

pacientes estudados. Entretanto, foi constatado que uma relativa contribuição do HPV à carcinogênese oral pode ocorrer em um subgrupo de pacientes não expostos ao tabaco.

- Os resultados da análise multivariada (regressão de Cox) confirmaram a idade, a localização anatômica tumoral e a imunexpressão da proteína p53 como variáveis independentes para predição da sobrevida dos pacientes com carcinoma epidermóide oral.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

Ahomadegbe JC, Barrois M, Fogel S, Le Bihan ML, Douc-Rasy S, Duvillard P, et al. High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. *Oncogene* 1995; 10(6): 1217-27.

Anderson WF, Hawk E, Berg CD. Secondary chemoprevention of upper aerodigestive tract tumors. *Semin Oncol* 2001; 28(1): 106-20.

Anensen N, Oyan AM, Bourdon JC, Kalland KH, Bruserud O, Gjertsen BT. A distinct p53 protein isoform signature reflects the onset of induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2006; 12(13): 3985-92.

Anneroth G, Hansen LS, Silverman S Jr. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. *J Oral Pathol* 1986; 15(3): 162-8.

Antoniades DZ, Styanidis 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 - I. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B(5): 333-9.

Antunes AA, Antunes AP. Estudo retrospectivo e revisão de literatura dos tumores dos lábios: experiência de 28 anos. *Rev Bras Cancerol* 2004; 50(4): 295-00.

Apt D, Watts RM, Suske G, Bernard HU. High Sp1/Sp3 ratios in epithelial cells during epithelial differentiation and cellular transformation correlate with the activation of the HPV-16 promoter. *Virology* 1996; 224 (1): 281-91.

Asakage T, Yokose T, Mukai K, Tsugane S, Tsubono Y, Asai M, et al. Tumor thickness predicts cervical metastasis in patients with stage I/II carcinoma of the tongue. *Cancer* 1998; 82(8): 1443-8.

Balaram P, Nalinakumari KR, Abraham E, Balan A, Hareendran NK, Bernard HU, et al. Human papillomaviruses in 91 oral cancers from Indian betel quid chewers--high prevalence and multiplicity of infections. *Int J Cancer* 1995; 61(4): 450-4.

Balaram P, Sridhar H, Rajkumar T, Vaccarella S, Herrero R, Nandakumar A, et al. Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene. *Int J Cancer* 2002; 98(3): 440-5.

Barbieri CE, Perez CA, Johnson KN, Ely KA, Billheimer D, Pietenpol JA. IGFBP-3 is a direct target of transcriptional regulation by DeltaNp63alpha in squamous epithelium. *Cancer Res* 2005; 65(6): 2314-20.

\* Normatizado de acordo com o Sistema Vancouver:

Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journals. International Committee of Medical Journal Editors. *JAMA* 1993; 269: 2282-6.

Beltrami CA, Desinan L, Rubini C. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. A retrospective study of 80 cases. *Pathol Res Pract* 1992; 188(4-5): 510-6.

Bergman SA, Ord RA, Rothman M. Accuracy of clinical examination versus computed tomography in detecting occult lymph node involvement in patients with oral epidermoid carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 1994; 52(12): 1236-9.

Berkhout RJ, Tieben LM, Smits HL, Bavinck JN, Vermeer BJ, ter Schegget J. Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancers from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1995; 33(3): 690-5.

Bishop JW, Emanuel JM, Sims KL. Disseminated mucosal papilloma/condyloma secondary to human papillomavirus. *Am J Surg Pathol* 1998; 22(10): 1291-5.

Boldrup L, Bourdon JC, Coates PJ, Sjostrom B, Nylander K. Expression of p53 isoforms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer* 2007; 43(3): 617-23.

Borresen-Dale AL. TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* 2003; 21(3): 292-00.

Bortoluzzi MC, Yurgel LS, Dekker NP, Jordan RC, Regezi JA. Assessment of p63 expression in oral squamous cell carcinomas and dysplasias. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 98(6): 698-04.

Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(11): 796-802.

Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, et al. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 2005; 19(18): 2122-37.

Bourdon JC. p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* 2007; 97(3): 277-82.

Boy S, Van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Dreyer L, van Heerden M, van Heerden W. HPV detection in primary intra-oral squamous cell carcinomas--commensal, aetiological agent or contamination? *J Oral Pathol Med* 2006; 35(2): 86-90.

Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al. The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 1993; 53(19): 4477-80.

Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 2002; 24(2): 198-06.

Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 2004; 33(6): 317-22.



Brachman DG, Graves D, Vokes E, Beckett M, Haraf D, Montag A, et al. Occurrence of p53 gene deletions and human papilloma virus infection in human head and neck cancer. *Cancer Res* 1992; 52(17): 4832-6.

Braithwaite AW, Royds JA, Jackson P. The p53 story: layers of complexity. *Carcinogenesis* 2005, 26 (7): 1161-9.

Brandão LG, Cavalheiro BG, Sondermann A. Apresentação clínica e estadiamento. In: Parize Jr O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. p71-9.

Brandwein M, Zeitlin J, Nuovo GJ, MacConnell P, Bodian C, Urken M, et al. HPV detection using "hot start" polymerase chain reaction in patients with oral cancer: a clinicopathological study of 64 patients. *Mod Pathol* 1994; 7(7): 720-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer-INCA. Carcinoma epidermóide da cabeça e pescoço. *Rev Bras Cancerol* 2001; 47(4): 361-76.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer-INCA. Prevenção e controle de câncer: normas e recomendações do INCA. *Rev Bras Cancerol* 2002; 48(3): 317-32.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer-INCA. Prevenção do câncer de boca. *Rev Bras Cancerol* 2003; 49(4): 206.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. 254p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2005. 94p.

Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995; 332(11): 712-7.

Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994; 30B(5): 323-8.

Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1): 1-17.

Burns JE, McFarlane R, Clark LJ, Mitchell R, Robertson G, Soutar D, et al. Maintenance of identical p53 mutations throughout progression of squamous cell carcinomas of the tongue. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994; 30B(5): 335-7.

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56(11): 2488-92.

Candi E, Rufini A, Terrinoni A, Dinsdale D, Ranalli M, Paradisi A, et al. Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: selective genetic complementation in p63 null mice. *Cell Death Differ* 2006; 13(6): 1037-47.

Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2000; 6(11): 4171-5.

Carvalho AL, Magrin J, Kowalski LP. Sites of recurrence in oral and oropharyngeal cancers according to the treatment approach. *Oral Dis* 2003; 9(3): 112-8.

Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck* 2004; 26(1): 31-8.

Carvalho C. Cresce incidência de câncer da boca no Brasil. *Rev Bras Odontol* 2003; 60(1): 36-9.

Carvalho MB, Lenzi J, Lehn CN, Fava AS, Amar A, Kanda JL, et al. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. *Rev Assoc Med Brás* 2001; 47(3): 208-14.

Casiglia J, Woo SB. A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent* 2001; 49(1): 72-82.

Castro TP, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Rev Bras Otorrinolaringol (Engl Ed)* 2006; 72(2): 272-82.

Chang F, Syrjanen S, Nuutinen J, Karja J, Syrjanen K. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous cell carcinomas by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Dermatol Res* 1990; 282(8): 493-7.

Charabi B, Topping H, Kirkegaard J, Hansen HS. Oral cancer - results of treatment in the Copenhagen University Hospital. *Acta Otolaryngol Suppl* 2000; 543: 246-7.

Chatterjee R, Mukhopadhyay D, Murmu N, Mitra PK. Correlation between human papillomavirus DNA detection in maternal cervical smears and buccal swabs of infants. *Indian J Exp Biol* 1998; 36(2): 199-02.

Chehab FF, Der Kaloustian V, Khouri FP, Deeb SS, Kan YW. The molecular basis of beta-thalassemia in Lebanon: application to prenatal diagnosis. *Blood* 1987; 69(4): 1141-5.

Chen YK, Hsue SS, Lin LM. Expression of p63 (TA and deltaN isoforms) in human primary well differentiated buccal carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33(5): 493-7.

Choi HR, Batsakis JG, Zhan F, Sturgis E, Luna MA, EL-Naggar AK. Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis. *Hum Pathol* 2002; 33(2): 158-64.

CID-10 Classificação Estatística Internacional de Doenças e Problemas Relacionados à Saúde. 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: EDUSP; 1997.

Correnti M, Rivera H, Cavazza ME. Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. *Oral Dis* 2004; 10: 163-6.

Costa Ade L, Pereira JC, Nunes AA, Arruda Mde L. Correlation between TNM classification, histological grading and anatomical location in oral squamous cell carcinoma. *Pesqui Odontol Bras* 2002; 16(3): 216-20.

Costa MAM. Condições de saúde e de higiene bucal dos pacientes com câncer de boca referendados ao Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP [Dissertação]. Ribeirão Preto: FMRP-USP; 2005.

Cox B, Taylor K, Treasure E. Trends in oral cancer by subsite in New Zealand. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 31B(2): 113-7.

Crook T, Nicholls JM, Brooks L, O'niions J, Allday MJ. High level expression of deltaN-p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene* 2000; 19 (30): 3439–44.

Cruz IB, Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996; 32B(1): 55-62.

D'cruz AK, Mulherkar R. Optimizing treatment in head and neck cancers -- are molecular markers the answer? *Indian J Med Res* 2005; 122(3): 196-8.

Dahlgren L, Dahlstrand HM, Lindquist D, Hogmo A, Bjornestal L, Lindholm J, et al. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. *Int J Cancer* 2004; 112(6): 1015-9.

Dahlstrom KR, Adler-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, et al. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res* 2003; 9(7): 2620-6.

Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 9): 2327-36.

Das BR, Nagpal JK. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit* 2002; 8(11): RA258-67.

de Aguiar AF Jr, Kowalski LP, de Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. *Oral Oncol* 2007; 43(6): 593-01.

De Laurenzi V, Melino G. Evolution of functions within the p53/p63/p73 family. *Ann NY Acad Sci* 2000; 926: 90-100.

de Mejia EG, Bradford T, Hasler C. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. *Nutr Rev* 2003; 61(7): 239-46.

de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76(Pt 4): 1057-62.

Carlos de Vicente J, Junquera Gutiérrez LM, Zapatero AH, Fresno Forcelledo MF, Hernández-Vallejo G, López Arranz JS. Prognostic significance of p53 expression in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. *Head Neck* 2004; 26(1): 22-30.

Dedivitis RA, França CM, Mafra AC, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2004; 70(1): 35-40.

Di Como CJ, Urist MJ, Babayan I, Drobnjak M, Hedvat CV, Teruya-Feldstein J, et al. p63 expression profiles in human normal and tumor tissues. *Clin Cancer Res* 2002; 8(2): 494-01.

Dohn M, Zhang S, Chen X. P63alpha and deltaNp63alpha can induce cell cycle arrest and apoptosis and differentially regulate p53 target genes. *Oncogene* 2001; 20(25): 3193-205.

Elamin F, Steingrimsdottir H, Wanakulasuriya S, Johnson N, Tavassoli M. Prevalence of human papillomavirus infection in premalignant and malignant lesions of the oral cavity in UK subjects: a novel method of detection. *Oral Oncol* 1998; 34(3): 191-7.

Evander M, Edlund K, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, et al. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. *J Infect Dis* 1995; 171(4): 1026-30.

Famulski W, Sulkowska M, Miller-Famulska D, Terlikowski S, Guzińska-Ustymowicz K, Sulkowski S. P53 protein expression in oral squamous cell cancer in relation to some of its clinicopathological variables. *Folia Histochem Cytobiol* 2002; 40(2): 203-4.

Farthing A, Masterson P, Mason WP, Vousden KH. Human papillomavirus detection by hybrid capture and its possible clinical use. *J Clin Pathol* 1994; 47(7): 649-52.

Favre M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J Virol* 1975; 15(5): 1239-47.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759-67.

Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA, Rapp AK, Phillips LA, McGovern R, et al. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* 2003; 22(46): 7233-42.

Ferlito A, Shaha AR, Rinaldo A. The incidence of lymph node micrometastases in patients pathologically staged N0 in cancer of oral cavity and oropharynx. *Oral Oncol* 2002; 38(1): 3-5.

Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. *Mol Cell Biol* 1988; 8(2): 531-9.

Fisher DE. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2001; 15(5): 931-56.

Flores ER, Lambert PF. Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol* 1997; 71(10): 7167-79.

Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Sattler CA, Lambert PF. Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line. *Virology* 1999; 262(2): 344-54.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 2001; 345(26): 1890-00.

Foschini MP, Gaiba A, Cocchi R, Pennesi MG, Gatto MR, Frezza GP, et al. Pattern of p63 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Virchows Arch* 2004; 444(4): 332-9.

Fouret P, Monceaux G, Temam S, Lacourreye L, St Guily JL. Human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinomas in nonsmokers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 123(5): 513-6.

Franco EL, Dib LL, Pinto DS, Lombardo V, Contesini H. Race and gender influences on the survival of patients with mouth cancer. *J Clin Epidemiol* 46(1): 37-46, 1993.

Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis* 1999; 180(5): 1415-23.

Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res* 2001; 61(6): 2505-12.

Gervásio OL, Dutra RA, Tartaglia SM, Vasconcellos WA, Barbosa AA, Aguiar MC. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. *Braz Dent J* 2001; 12(1): 57-61.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(9): 709-20.

Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol* 2004; 31(6): 744-54.

Glickman JN, Yang A, Shahsafaei A, McKeon F, Odze RD. Expression of p53-related protein p63 in the gastrointestinal tract and in esophageal metaplastic and neoplastic disorders. *Hum Pathol* 2001; 32(11): 1157-65.

Goldschneider D, Horvilleur E, Plassa LF, Guillaud-Bataille M, Million K, Wittmer-Dupret E, et al. Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(19): 5603-12.

González-Moles MA, Rodríguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, González-Moles S, Marfil-Alvarez R. Increase of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in HPV-18 positive oral squamous cell carcinomas. *Acta Stomatol Belg* 1996; 93(3): 113-8.

Gonzalez-Moles MA, Galindo P, Gutierrez-Fernandez J, Sanchez-Fernandez E, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, et al. P53 protein expression in oral squamous cell carcinoma survival analysis. *Anticancer Res* 2001; 21(4B): 2889-94.

Goto M, Tsukamoto T, Inada K, Mizoshita T, Ogawa T, Terada A, et al. Loss of p21WAF1/CIP1 expression in invasive fronts of oral tongue squamous cell carcinomas is correlated with tumor progression and poor prognosis. *Oncol Rep* 2005; 14(4): 837-46.

Grabenbauer GG, Mühlfriedel C, Rödel F, Niedobitek G, Hornung J, Rödel C, et al. Squamous cell carcinoma of the oropharynx: Ki-67 and p53 can identify patients at high risk for local recurrence after surgery and postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48(4): 1041-50.

Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(4): 188-96.

Hagiwara K, Mcmenamin MG, Miura K, Harris CC. Mutational analysis of the p63/p73L/p51/p40/CUSP/KET gene in human cancer cell lines using intronic primers. *Cancer Res* 1999; 59(17): 4165-9.

Hall PA, Woodman AC, Campbell SJ, Shepherd NA. Expression of the p53 homologue p63alpha and DeltaNp63alpha in the neoplastic sequence of Barrett's oesophagus: correlation with morphology and p53 protein. *Gut* 2001; 49(5): 618-23.

Haraf DJ, Nodzinski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, et al. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res* 1996; 2(4): 755-62.

Hasebe T, Mukai K, Yamaguchi N, Ishihara K, Kaneko A, Takasaki Y, et al. Prognostic value of immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen, p53, and c-erbB-2 in sebaceous gland carcinoma and sweat gland carcinoma: comparison with histopathological parameter. *Mod Pathol* 1994; 7(1): 37-43.

Heise CC, Williams AM, Xue S, Propst M, Kirn DH. Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Res* 1999; 59(11): 2623-8.

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al.; IARC Multicenter Oral Cancer Study Group. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(23): 1772-83.

Hibi K, Trink B, Patturajan M, Westra WH, Caballero OL, Hill DE, et al. AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(10): 5462-7.

Hicks WL Jr, North JH Jr, Loree TR, Maamoun S, Mullins A, Orner JB, et al. Surgery as a single modality therapy for squamous cell carcinoma of the tongue. *Am J Otolaryngol* 19(1): 24-8, 1998.

Hiratsuka H, Miyakawa A, Nakamori K, Kido Y, Sunakawa H, Kohama G. Multivariate analysis of occult lymph node metastasis as a prognostic indicator for patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1997; 80(3): 351-56.

Holladay EB, Gerald WL. Viral gene detection in oral neoplasms using the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* 1993; 100(1): 36-40.

Horowitz AM, Goodman HS, Yellowitz JA, Nourjah PA. The need for health promotion in oral cancer prevention and early detection. *J Public Health Dent* 1996; 56(6): 319-30.

Howell RE, Gallant L. Human papillomavirus type 16 in an oral squamous carcinoma and its metastasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 74(5): 620-6.

Hsing AW, Burk RD, Liaw KL, Chen CJ, Zhang T, Schiffman M, et al. Interlaboratory agreement in a polymerase chain reaction-based human papillomavirus DNA assay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5(6): 483-4.

Hupp TR, Lane DP, Ball KL. Strategies for manipulating the p53 pathway in the treatment of human cancer. *Biochem J* 2000; 352 Pt 1: 1-17.

Ibieta BR, Lizano M, Fras-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruz-Godoy L, et al. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99(3): 311-5.

International Agency for Research on Cancer. IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Human papillomaviruses. Vol 64. Lyon (France): IARC; 1995.

Iype EM, Pandey M, Mathew A, Thomas G, Sebastian P, Nair MK. Oral cancer among patients under the age of 35 years. *J Postgrad Med* 2001; 47(3): 171-6.

Jalal H, Sanders CM, Prime SS, Scully C, Maitland NJ. Detection of human papilloma virus type 16 DNA in oral squames from normal young adults. *J Oral Pathol Med* 1992; 21(10): 465-70.

Jefferies S, Foulkes WD. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2001; 37(2): 115-26.

Jones AS, Roland NJ, Field JK, Phillips DE. The level of cervical lymph node metastases: their prognostic relevance and relationship with head and neck squamous carcinoma primary sites. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1994; 19(1): 63-9.

Jovanovic A, Schulten EA, Kostense PJ, Snow GB, van der Waal I. Squamous cell carcinoma of the lip and oral cavity in The Netherlands; an epidemiological study of 740 patients. *J Craniomaxillofac Surg* 1993; 21(4): 149-52.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 1958; 53: 457-81.

Kastan MB, Zhan Q, el-Deiry WS, Carrier F, Jacks T, Walsh WV, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* 1992; 71(4): 587-97.

Kannan K, Amarglio N, Rechavi G, Givol D. Profile of gene expression regulated by induced p53: connection to the TGF-beta family. *FEBS Lett* 2000; 470(1): 77-82.

Kansky AA, Poljak M, Seme K, Kocjan BJ, Gale N, Luzar B, et al. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. *Acta Virol* 2003; 47(1): 11-6.

Kaugars GE, Riley WT, Brandt RB, Burns JC, Svirsky JA. The prevalence of oral lesions in smokeless tobacco users and an evaluation of risk factors. *Cancer* 1992; 70(11): 2579-85.

Kerdpon D, Sriplung H. Factors related to advanced stage oral squamous cell carcinoma in southern Thailand. *Oral Oncol* 2001; 37(3): 216-21.

Khademi B, Shirazi FM, Vasei M, Doroudchi M, Gandomi B, Modjtahedi H, et al. The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Lett* 2002; 184(2): 223-30.

King KE, Ponnampereuma RM, Gerdes MJ, Tokino T, Yamashita T, Baker CC, et al. Unique domain functions of p63 isoforms that differentially regulate distinct aspects of epidermal homeostasis. *Carcinogenesis* 2006; 27(1): 53-63.

King KE, Weinberg WC. p63: defining roles in morphogenesis, homeostasis, and neoplasia of the epidermis. *Mol Carcinog* 2007; 46(8): 716-24.

Kiyabu MT, Shibata D, Arnheim N, Martin WJ, Fitzgibbons PL. Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. *Am J Surg Pathol* 1989; 13(3): 221-4.

Koch A, Hansen SV, Nielsen NM, Palefsky J, Melbye M. HPV detection in children prior to sexual debut. *Int J Cancer* 1997; 73(5): 621-4.

Koga F, Kawakami S, Fujii Y, Saito K, Ohtsuka Y, Iwai A, et al. Impaired p63 expression associates with poor prognosis and uroplakin III expression in invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 2003; 9(15): 5501-7.



Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, Leelakriangsak M, Amornphimoltham P. Alterations of p53, pRb, cyclin D1 and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2000; 36(4): 334-9.

Kösel S, Burggraf S, Mommsen J, Engelhardt W, Olgemöller B. Type-specific detection of human papillomaviruses in a routine laboratory setting--improved sensitivity and specificity of PCR and sequence analysis compared to direct hybridisation. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(6): 787-91.

Kowalski LP, Nishimoto IK. Epidemiologia do câncer de boca. In: Parize Jr O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000. p3-11.

Kowalski ISG, Souza CP. Social representations of relatives and patients with oral and oropharyngeal squamous carcinoma on the prevention and diagnosis of cancer. *Acta Oncol Bras* 21(1): 206-10, 2001.

Kropveld A, Van Mansfeld AD, Nabben N, Hordijk GJ, Slootweg PJ. Discordance of p53 status in matched primary tumours and metastases in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1996; 32B(6): 388-93.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278(5701): 261-3.

Lin Z, Liu M, Li Z, Kim C, Lee E, Kim I. DeltaNp63 protein expression in uterine cervical and endometrial cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006; 132(12): 811-6.

Lindhe J. Tratado de periodontia clínica e implantologia oral. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005.

Lingen MW, Chang KW, McMurray SJ, Solt DB, Kies MS, Mittal BB, et al. Overexpression of p53 in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients with no known risk factors is not associated with mutations in exons 5-9. *Head Neck* 2000; 22(4): 328-35.

Lippman SM, Hong WK. Second malignant tumors in head and neck squamous cell carcinoma: the overshadowing threat for patients with early-stage disease. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1989; 17(3): 691-4.

Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol* 2001; 37(5): 401-18.

Lo Muzio L, Santarelli A, Caltabiano R, Rubini C, Pieramici T, Trevisiol L, et al. p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Hum Pathol* 2005; 36(2): 187-94

Lopes MA, Nikitakis NG, Reynolds MA, Ord RA, Sauk J Jr. Biomarkers predictive of lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60(2): 142-7.

Lowe SW, Bodis S, McClatchey A, Remington L, Ruley HE, Fisher DE, et al. p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science* 1994; 266(5186): 807-10.

Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 79(3): 321-9.

Lydiatt DD, Robbins KT, Byers RM, Wolf PF. Treatment of stage I and II oral tongue cancer. *Head Neck* 1993; 15(4): 308-12.

Macfarlane GJ, Macfarlane TV, Lowenfels AB. The influence of alcohol consumption on worldwide trends in mortality from upper aerodigestive tract cancers in men. *J Epidemiol Community Health* 1996; 50(6): 636-9.

Maden C, Beckmann AM, Thomas DB, McKnight B, Sherman KJ, Ashley RL, et al. Human papillomaviruses, herpes simplex viruses, and the risk of oral cancer in men. *Am J Epidemiol* 1992; 135(10): 1093-02.

Maitland NJ, Cox MF, Lynas C, Prime SS, Meanwell CA, Scully C. Detection of human papillomavirus DNA in biopsies of human oral tissue. *Br J Cancer* 1987; 56(3): 245-50.

Mansour OI, Snyderman CH, D'amico F. Association between tobacco use and metastatic neck disease. *Laryngoscope* 2003; 113(1): 161-6.

Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001; 20(54): 7874-87.

Martin-Granizo R, Rodriguez-Campo F, Naval L, Diaz Gonzalez FJ. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients younger than 40 years. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1997; 117(3 Pt 1): 268-75.

Mashberg A, Samit AM. Early detection, diagnosis, and management of oral and oropharyngeal cancer. *CA Cancer J Clin* 1989; 39(2): 67-88.

Massion PP, Taflan PM, Jamshedur Rahman SM, Yildiz P, Shyr Y, Edgerton ME, et al. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. *Cancer Res* 2003; 63(21): 7113-21.

Matzow T, Boysen M, Kalantari M, Johansson B, Hagmar B. Low detection rate of HPV in oral and laryngeal carcinomas. *Acta Oncol* 1998; 37(1): 73-6.

McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 1998; 20(3): 250-65.

Miguel RE, Villa LL, Cordeiro AC, Prado JC, Sobrinho JS, Kowalski LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *Am J Surg* 1998; 176(5): 428-9.

Miller CS, Zeuss MS, White DK. Detection of HPV DNA in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 77(5): 480-6.

Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996; 82(1): 57-68.

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91(6): 622-35.

Mohit-Tabatabai MA, Sobel HJ, Rush BF, Mashberg A. Relation of thickness of floor of mouth stage I and II cancers to regional metastasis. *Am J Surg* 1986; 152(4): 351-3.

Moll UM, Erster S, Zaika A. p53, p63 and p73--solos, alliances and feuds among family members. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1552(2): 47-59.

Moore RJ, Doherty DA, Do KA, Chamberlain RM, Khuri FR. Racial disparity in survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx. *Ethn Health* 2001; 6(3-4): 165-77.

Moreira CA, Lopes A, Donato AC, Milner E, Mistro FZ, Kignel S. Epidemiologia do carcinoma espinocelular da boca: análise de 244 casos. *Rev Paul Odontol* 1997; 19(6): 24-7.

Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001; 344(15): 1125-31.

Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al.; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(6): 518-27.

Nakayama A, Ogawa A, Fukuta Y, Kudo K. Relation between lymphatic vessel diameter and clinicopathologic parameters in squamous cell carcinomas of the oral region. *Cancer* 1999; 86(2): 200-6.

Noszczyk BH, Majewski ST. P63 expression during normal cutaneous wound healing in humans. *Plast Reconstr Surg* 2001; 108(5): 1242-7.

Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med* 2000; 29(9): 413-25.

Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, Lindgren B, Roos G, Zhanxiang W, et al. Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells. *J Pathol* 2002; 198(4): 417-27.

Okada Y, Mataga I, Katagiri M, Ishii K. An analysis of cervical lymph nodes metastasis in oral squamous cell carcinoma. Relationship between grade of histopathological malignancy and lymph nodes metastasis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32(3): 284-8.

Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54(8): 949-54.

Ord RA. Discussion. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 1996; 54(8): 955.

Osaki T, Kimura T, Tatemoto Y, Yamamoto T, Yoneda K. Risk factors of metastasis in oral squamous cell carcinomas. *Oncology* 2000; 58(2): 137-43.

Padayachee A. Human papillomavirus (HPV) types 2 and 57 in oral verrucae demonstrated by in situ hybridization. *J Oral Pathol Med* 1994; 23(9): 413-7.

Park NH, Min BM, Li SL, Huang MZ, Cherick HM, Doniger J. Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus. *Carcinogenesis* 1991; 12(9): 1627-31.

Park NH, Gujuluva CN, Baek JH, Cherrick HM, Shin KH, Min BM. Combined oral carcinogenicity of HPV-16 and benzo(a)pyrene: an in vitro multistep carcinogenesis model. *Oncogene* 1995; 10(11): 2145-53.

Park BJ, Lee SJ, Kim JI, Lee SJ, Lee CH, Chang SG, et al. Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. *Cancer Res* 2000; 60(13): 3370-4.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55(2): 74-108.

Parsa R, Yang A, Mckeon F, Green H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999; 113(6): 1099-105.

Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO. The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. *Genes Dev* 1993; 7(12B): 2556-64.

Pellegrini G, Dellambra E, Golisano O, Martinelli E, Fantozzi I, Bondanza S, et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(6): 3156-61.

Peller S, Halevy A, Slutzki S, Kopilova Y, Rotter V. p53 mutations in matched primary and metastatic human tumors. *Mol Carcinog* 1995; 13(3): 166-72.

Perez MA, Raimondi AR, Itoiz ME. An experimental model to demonstrate the carcinogenic action of oral chronic traumatic ulcer. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(1): 17-22.

Perussi MR, Denardin OV, Fava AS, Rapoport A. Carcinoma epidermóide da boca em idosos de São Paulo. *Rev Assoc Med Bras* 2002; 48(4): 341-4.

Pithan SA, Cherubini K, Figueiredo MA, Yurgel LS. Perfil epidemiológico do carcinoma espinocelular de boca em pacientes do serviço de estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS. *Revista Odonto Ciência – Fac Odonto/PUCRS* 2004; 19(44): 126-30.

Ramalho LN, Maggiori MS, Ribeiro-Silva A, Peres LC. P63 expression in hydropic abortion and gestational trophoblastic diseases. *Placenta* 2006; 27(6-7): 740-3.

Ratovitski EA, Patturajan M, Hibi K, Trink B, Yamaguchi K, Sidransky D. p53 associates with and targets Delta Np63 into a protein degradation pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(4): 1817-22.

Reis-Filho JS, Torio B, Albergaria A, Schmitt FC. p63 expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. *J Cutan Pathol* 2002; 29(9): 517-23.

Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kühndel K, Liebert UG. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. *J Clin Virol* 2004; 30(4): 302-8.

Rivero ER, Nunes FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. *Braz Oral Res* 2006; 20(1): 21-4.

Rothman KJ. The proportion of cancer attributable to alcohol consumption. *Prev Med* 1980; 9(2): 174-9.

Rous P, Beard JW. The progression to carcinoma of virus induced rabbit papillomas. *J Exp Med* 1935; 62: 523.

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; 324(6093): 163-6.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 1994; 17(5): 914-21.

Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res* 1998; 18(6B): 4779-86.

Sarini J, Fournier C, Lefebvre JL, Bonafos G, Van JT, Coche-Dequeant B. Head and neck squamous cell carcinoma in elderly patients. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001; 127(9): 1089-92.

Sauter ER, Ridge JA, Gordon J, Eisenberg BL. p53 overexpression correlates with increased survival in patients with squamous carcinoma of the tongue base. *Am J Surg* 1992; 164(6): 651-3.

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(3): 268-74.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993; 75(3): 495-05.

Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32(3): 233-45.

Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(21): 1626-36.

Sciubba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol* 2001; 2(4): 239-51.

Scully C. Oral cancer; the evidence for sexual transmission. *Br Dent J* 2005; 199(4): 203-7.

Shah JP, Candela FC, Poddar AK. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1990; 66(1): 109-13.

Shah JP, Lydiatt W. Treatment of cancer of the head and neck. *Cancer J Clin* 1995; 45(6): 352-68.

Shanmugaratnam S. Histologic typing of tumors of the upper respiratory tract and ear. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 1991.

Shen Z, Pardington-Purtymun PE, Comeaux JC, Moyzis RK, Chen DJ. Associations of UBE2I with RAD52, UBL1, p53, and RAD51 proteins in a yeast two-hybrid system. *Genomics* 1996; 37(2): 183-6.

Shin KH, Tannyhill RJ, Liu X, Park NH. Oncogenic transformation of HPV-immortalized human oral keratinocytes is associated with the genetic instability of cells. *Oncogene* 1996; 12(5): 1089-96.

Shintani S, Matsuura H, Hasegawa Y, Nakayama B, Fujimoto Y. The relationship of shape of tumor invasion to depth of invasion and cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oncology* 1997; 54(6): 463-7

Shope RE, Hurst EW. Infectious papillomatosis of rabbits, with a note on histopathology. *J Exp Med* 1933; 58: 607-24.

Siegelmann-Danieli N, Ben-Izhack O, Hanlon A, Ridge JA, Stein ME, Khandelwal V, et al. P53 alteration in oral tongue cancer is not significantly associated with age at diagnosis or tobacco exposure. *Tumori* 2005; 91(4): 346-50.

Silverman SJ, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984; 53(3): 563-8.

Sirvent JJ, Fortuño-Mar A, Olona M, Orti A. Prognostic value of p53 protein expression and clinicopathological factors in infiltrating ductal carcinoma of the breast. A study of 192 patients. *Histol Histopathol* 2001; 16(1): 99-06.

Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol* 1999; 35(6): 583-9.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 6(5): 963-8.

Smith EM, Johnson SR, Cripe T, Perlman S, McGuinness G, Jiang D, et al. Perinatal transmission and maternal risks of human papillomavirus infection. *Cancer Detect Prev* 1995; 19(2): 196-05.

Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope* 1998; 108(7): 1098-03.

Snijders PJ, Meijer CJ, van den Brule AJ, Schrijnemakers HF, Snow GB, Walboomers JM. Human papillomavirus (HPV) type 16 and 33 E6/E7 region transcripts in tonsillar carcinomas can originate from integrated and episomal HPV DNA. *J Gen Virol* 1992; 73(Pt 8): 2059-66.

Sobin LH, Wittekind CH. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 6<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons; 2002

Sousa TRB. *Papilomavírus humano e a detecção do DNA viral no carcinoma epidermóide da cavidade oral: revisão da literatura [Dissertação]*. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2001.

Soussi T, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *J Mol Biol* 1996; 260(5): 623-37.

Souza A, Stevaux OM, Santos GG, Marcucci G. Epidemiologia do carcinoma epidermóide da mucosa bucal – contribuição ao estudo sobre três variáveis: sexo, faixa etária e raça. *Rev Odontol UNICID* 1996; 8(2): 127-34.

Speight PM, Morgan PR. The natural history and pathology of oral cancer and precancer. *Community Dent Health* 1993; 10(Suppl 1): 31-41.

Spiro RH, Huvos AG, Wong GY, Spiro JD, Gnecco CA, Strong EW. Predictive value of tumor thickness in squamous carcinoma confined to the tongue and floor of the mouth. *Am J Surg* 1986; 152(4): 345-50.

Steenbergen RD, Hermsen MA, Walboomers JM, Joenje H, Arwert F, Meijer CJ, et al. Integrated human papillomavirus type 16 and loss of heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivative cell line. *Cancer Res* 1995; 55(22): 5465-71.

Steinberg BM. Human papillomaviruses and upper airway oncogenesis. *Am J Otolaryngol* 1990; 11(6): 370-4.

Steinberg BM, DiLorenzo TP. A possible role for human papillomaviruses in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1996; 15(1): 91-112.

Sugerman PB, Savage NW. Oral cancer in Australia: 1983-1996. *Aust Dent J* 2002; 47(1): 45-56.

Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91(1): 62-9.

Suskind DL, Mirza N, Rosin D, Stanton D, Sachdeva R. Condyloma acuminatum presenting as a base-of-tongue mass. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 114(3): 487-90.

Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983; 12(6): 418-24.

Syrjanen SM. Basic concepts and practical applications of recombinant DNA techniques in detection of human papillomavirus (HPV) infection. *APMIS* 1990; 98(2): 95-110.

Syrjanen SM, Syrjanen KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med* 1999; 31(3): 175-87.

Syrjanen S. Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol* 2003; 192(3): 123-8.

Takahashi Y, Noguchi T, Takeno S, Kimura Y, Okubo M, Kawahara K. Reduced expression of p63 has prognostic implications for patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2006; 15(2): 323-8.

Talamini R, Franceschi S, Barra S, La Vecchia C. The role of alcohol in oral and pharyngeal cancer in non-smokers, and tobacco in non-drinkers. *Int J Cancer* 1990; 46(3): 391-3.

Terai M, Hashimoto K, Yoda K, Sata T. High prevalence of human papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol* 1999; 14(4): 201-5.

Thurfjell N, Coates PJ, Boldrup L, Lindgren B, Bäcklund B, Uusitalo T, et al. Function and importance of p63 in normal oral mucosa and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Adv Otorhinolaryngol* 2005; 62: 49-57.

Tralongo V, Rodolico V, Luciani A, Marra G, Daniele E. Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. A review of the literature. *Anticancer Res* 1999; 19(4C): 3503-10.

Unal OF, Ayhan A, Hosal AS. Prognostic value of p53 expression and histopathological parameters in squamous cell carcinoma of oral tongue. *J Laryngol Otol* 1999; 113(5): 446-50.

Uobe K, Masuno K, Fang YR, Li LJ, Wen YM, Ueda Y, et al. Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR. *Oral Oncol* 2001; 37(2): 146-52.

Urist MJ, Di Como CJ, Lu ML, Charytonowicz E, Verbel D, Crum CP, et al. Loss of p63 expression is associated with tumor progression in bladder cancer. *Am J Pathol* 2002; 161(4): 1199-06.

van der Wall I, Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol* 1997; 33(5): 291-01.

van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Kummer JA, Denkers F, Dijkstra J, et al. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *J Pathol* 2002; 198(4): 476-86.



van Rensburg EJ, Engelbrecht S, Van Heerden WF, Raubennheimer EJ, Schoub BD. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas from an African population sample. *Anticancer Res* 1996; 16(2): 969-73.

Velly AM, Franco EL, Schlecht N, Pintos J, Kowalski LP, Oliveira BV, et al. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncology* 1998; 34(4): 284-91.

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med* 1993; 328(3): 184-94.

Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Chikhlikar PR. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: Multivariate analysis. *J Surg Oncol* 2003; 82(1): 34-50.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999; 189(1): 12-9.

Wang TY, Chen BF, Yang YC, Chen H, Wang Y, Cviko A et al. Histologic and immunophenotypic classification of cervical carcinomas by expression of the p53 homologue p63: a study of 250 cases. *Hum Pathol* 2001; 32(5): 479-86.

Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol* 2001; 194(3): 294-7.

Watts DH, Koutsky LA, Holmes KK, Goldman D, Kuypers J, Kiviat NB, et al. Low risk of perinatal transmission of human papillomavirus: results from a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 178(2): 365-73.

Weber A, Bellmann U, Bootz F, Wittekind C, Tannapfel A. Expression of p53 and its homologues in primary and recurrent squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 2002; 99(1): 22-8.

Wen S, Tsuji T, Li X, Mizugaki Y, Hayatsu Y, Shinozaki F. Detection and analysis of human papillomavirus 16 and 18 homologous DNA sequences in oral lesions. *Anticancer Res* 1997; 17(1A): 307-11.

Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res* 2004; 64(11): 3878-84.

Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 1998; 152(1): 145-56.

Wildt J, Bundgaard T, Bentzen SM. Delay in the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1995; 20(1): 21-5.

Willen R, Nathanson A, Moberger G, Anneroth G. Squamous cell carcinoma of the gingiva. Histological classification and grading of malignancy. *Acta Otolaryngol* 1975; 79(1-2): 146-54.

Woods KV, Shillitoe EJ, Spitz MR, Schantz SP, Adler-Storthz K. Analysis of human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1993; 22(3): 101-8.

Woolgar JA. Histological distribution of cervical lymph node metastases from intraoral/oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999; 37(3): 175-80.

World Health Organization. *Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa*. 2<sup>nd</sup> Ed. Berlin: Springer-Verlag; 1997.

Wu G, Osada M, Guo Z, Fomenkov A, Begum S, Zhao M, et al. DeltaNp63alpha up-regulates the Hsp70 gene in human cancer. *Cancer Res* 2005; 65(3): 758-66.

Wunsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002; 38(8): 737-46.

Wynford-Thomas D. P53 in tumour pathology: can we trust immunocytochemistry? *J Pathol* 1992; 166(4): 329-30.

Yamaguchi K, Wu L, Caballero OL, Hibi K, Trink B, Resto V, et al. Frequent gain of the p40/p51/p63 gene locus in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2000; 86(5): 684-9.

Yamaguchi H, Inokuchi K, Sakuma Y, Dan K. Mutation of the p51/p63 gene is associated with blastic crisis in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2001; 15(11): 1729-34.

Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell* 1998; 2(3): 305-16.

Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33(1): 71-4.

Zigeuner R, Tsybrovskyy O, Ratschek M, Rehak P, Lipsky K, Langner C. Prognostic impact of p63 and p53 expression in upper urinary tract transitional cell carcinoma. *Urology* 2004; 63(6): 1079-83.

Zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancer. *Cancer* 1987; 59(10): 1692-6.

Zur Hausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288(2): F55-78.

Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(5): 342-50.

**ANEXO A.**

**PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

**ANEXO B.****PROTOCOLO DE IMUNOHISTOQUÍMICA****Desenvolvido pelo Laboratório de Proliferação Celular do Departamento de  
Patologia da FMRP/USP**

1. Cortes de parafina com 4µm em lâminas silanizadas a 8%.

Nota: Se cortar o bloco de parafina pela manhã, colocar em estufa a 60°C até às 20 horas. Se cortar o tecido a tarde, os cortes deverão permanecer na estufa até o dia seguinte. No decorrer da noite, a temperatura da estufa não deve ultrapassar os 60°C, caso contrário os cortes podem ficar ressecados.

2. Desparafinizar em xilol I, II e III por 5 minutos cada (ou xilol I e II por 10 minutos cada).

3. Passar em álcoois decrescentes (3 minutos em álcool absoluto I, 3 minutos em álcool absoluto II, 1 minuto em álcool a 95% e 1 minuto em álcool a 70%).

4. Lavar em água corrente.

5. Colocar as lâminas em suporte com tampão citrato pH 6,0 (volume de 200ml para 20 lâminas).

6. Recuperação antigênica em panela de vapor: Mergulhar as lâminas em recipiente plástico com 400ml de tampão citrato pH 6,0 por 40 minutos.

Nota: Se o tampão citrato estiver previamente armazenado na geladeira, deve-se aquecê-lo no forno de microondas por 8 minutos (potência máxima) antes da recuperação.

7. Deixar esfriar por 30 a 40 minutos.

8. Separar os anticorpos, resfriados a 4°C.

Nota: Os anticorpos são armazenados em geladeira a 4°C.

9. Secar as lâminas ao redor dos cortes, formando “janelas”.

10. Lavar em tampão PBS (0,1M pH 7,4) por 3 vezes, aspirando a cada lavagem.

11. Pingar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (Peróxido de Hidrogênio). Deixar por 20 minutos.

12. Pingar uma gota de soro normal em cada fragmento (fornecido pelo Kit Universal Novocastra<sup>®</sup>). Deixar por 20 minutos.

13. Não lavar. Aspirar o soro normal.

14. Incubar as lâminas com o anticorpo primário correspondente a cada corte, nas seguintes diluições:

p53 – 1:100

p63 – 1:100

Homogeneizar através de movimentos pendulares com a mão. Colocar água para formar uma camada úmida. Tampar e cobrir com compressa, protegendo os fragmentos da luz. Incubar por duas horas.

Nota: Os anticorpos são previamente diluídos em BSA e conservados em geladeira a 4°C.

15. Lavar em tampão PBS (0,1M pH 7,4) por duas vezes, aspirando a cada lavagem. Lavar uma vez com TBS. Aspirar.

16. Incubar no anticorpo secundário universal por 15 minutos (fornecido pelo Kit Universal Novocastra<sup>®</sup>). Homogeneizar.

17. Lavar em PBS por 2 vezes, aspirando a cada lavagem. Lavar uma vez com TBS.

18. Incubar em Estreptavidina, uma gota por corte, por 10 minutos (fornecido pelo Kit Universal Novocastra<sup>®</sup>). Homogeneizar.
19. Lavar em PBS por três vezes, aspirando a cada lavagem.
20. Deixar as lâminas em PBS 0,1M pH 7,4.
21. Preparar o DAB: Misturar 0,16ml ou 160µl da solução B na solução A (Ver Anexo C). No momento do uso, não filtrar.
22. Aspirar as lâminas e colocar o DAB. Marcar 5 minutos. Observar os cortes. Se corar com menos de 5 minutos, lavar com PBS para inibir a continuação da reação.
23. Lavar em água corrente.
24. Contracorar com hematoxilina de Harris sem ácido por 30 segundos.
25. Lavar em água corrente.
26. Azular com água amoniacal. Lavar. Desidratar em álcoois. Diafanizar. Montar em Permaunt<sup>®</sup> (Fischer Scientific Company, Fair Lawn, NJ, USA).

## ANEXO C.

### REAGENTES E SOLUÇÕES DE IMUNOHISTOQUÍMICA

*Phosphate-Buffered Saline* (PBS) 0,1M pH 7,4 e NaCl 0,15M

NaCl	16,34g
Fosfato de Sódio Monobásico	0,72g
Fosfato de Sódio Dibásico	2,1g
H <sub>2</sub> O Destilada	2000ml

Acertar o pH com Hidróxido de Sódio

#### SOLUÇÃO ALBUMINA BOVINA (BSA)

Albumina bovina utilizada para diluição de anticorpos primários

#### SOLUÇÃO DE BSA

BSA	H <sub>2</sub> O Destilada
5g	100,00ml

Conservar em geladeira a 4°C

#### SOLUÇÃO DE USO:

Solução de BSA	1,25ml
Solução de NaN <sub>3</sub>	2,5ml
PBS 0,1M pH 7,4	59ml

Conservar em geladeira a 4°C.

## SOLUÇÃO MÃE DE ÁCIDO CÍTRICO

Ácido Cítrico	2,1g
H <sub>2</sub> O Destilada	1000ml

## TBS (Tris-Buffered-Saline Solution)

H <sub>2</sub> O destilada	1L
Cloreto de Sódio	8g
Tris	0,605g
HCL	4,4ml

## TAMPÃO CITRATO DE SÓDIO pH 6,0

Solução Mãe de Ácido Cítrico 90,00ml

H<sub>2</sub>O Destilada 810ml

Acertar o pH para 6,0 com NaOH.

Solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vol.) 10ml

PBS 0,1M pH 7,4 90ml

Conservar em geladeira a 4°C.

*3,3 – Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)*

## SOLUÇÃO A

DAB 5,00mg=0.005g

PBS 0,1M pH 7,4 5ml



## SOLUÇÃO B

PBS 0,1M pH 7,4

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 vol.)

187µl

20µl

No momento de uso, misturar 160µl da solução B na solução A, não filtrar.

## ÁGUA AMONIACAL

Hidróxido de amônio PA

4 gotas

Água Corrente

400ml

**ANEXO D.****PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE AMOSTRAS TECIDUAIS PARAFINIZADAS COM O KIT MAGNESIL TISSUE SYSTEM<sup>®</sup> – PROMEGA**

- Componentes do Kit Magnesil Tissue System<sup>®</sup> – Promega:

1. Módulo de processamento tecidual:

- Tampão de incubação (*Incubation buffer* – 35ml)
- Proteinase K (dois microtubos com 10mg cada)
- DTT 1M (microtubo com 1,125ml)

2. Módulo de purificação:

- Resina (0,9ml)
- Tampão Lise (*Lysis buffer* – 40ml)
- Tampão de lavagem (*Wash buffer 2X* – 30ml)
- Tampão de eluição (*Elution buffer* – 15ml)

Condições de armazenamento: Armazenar a Proteinase K e o DTT entre -15 e -25°C. Armazenar o tampão de incubação entre -25°C e 30°C. Todos os outros reagentes podem ser armazenados em temperatura ambiente.

- Componentes necessários a serem providenciados pelo pesquisador:

- Etanol 95–100% (15ml)
- Álcool isopropílico (15ml)

- Banho-maria a 56°C
- Estufa a 65°C
- Vórtex
- Microtubos de 1,5ml
- Micropipetas e ponteiras
- Plataforma magnética (*MagneSphere<sup>®</sup> Technology Magnetic Separation Stand* – Promega) para dois ou doze microtubos

## PROTOCOLO

**1-** Preparação das soluções de Proteinase K, DTT, Tampão de incubação (*Incubation buffer*) e Tampão de lavagem 1X (*1X Wash buffer*).

A. Adicionar 550µl do Tampão de incubação em cada microtubo contendo 10mg de Proteinase K liofilizada e agitar cuidadosamente para dissolver. A concentração final da Proteinase K será de 18mg/ml.

B. Dispensar a solução de Proteinase K em alíquotas de 100µl, esta solução deve ser congelada entre -15 e -25°C e pode ser descongelada até cinco vezes sem perda significativa de sua atividade. Devem ser utilizados dez microlitros desta solução por amostra.

C. Dispensar a solução de DTT 1M em pequenas alíquotas de 100µl e congelar entre -15 e -25°C.

D. Preparar uma solução para extração do DNA genômico de dez amostras, misturando 800µl de Tampão de incubação, 100µl de Proteinase K (18mg/ml) e 100µl de 1M DTT, para um volume final de 1ml. Agitar por três vezes cuidadosamente no vórtex. Para cada amostra de DNA genômico a ser extraído, utilizar 100µl desta solução.

Nota importante: Esta solução deve ser preparada somente no momento da extração do DNA genômico.

E. Para a preparação do Tampão de lavagem (*Wash buffer* 1X), deve-se adicionar 15ml de etanol (95–100%) e 15ml de álcool isopropílico ao frasco *Wash buffer* 2X. Após a mistura, fechar a tampa e agitar cuidadosamente por várias vezes. Marcar a tampa do tampão de lavagem como 1X, para recordar a adição dos álcoois. Armazenar a solução em temperatura ambiente. Fechar firmemente o frasco para prevenir a evaporação.

**2-** Procedimentos seqüenciais para extração e purificação do DNA genômico das amostras teciduais parafinizadas com o Kit Magnesil Tissue System<sup>®</sup> – Promega.

A. Colocar a amostra tecidual parafinizada em um microtubo de 1,5ml. Adicionar 100µl da solução para extração do DNA genômico (Tampão de incubação, Proteinase K 18mg/ml e DTT 1M) elaborada no momento. Incubar em banho-maria a 56°C por aproximadamente 12 horas (*overnight*).

B. Agitar o frasco da resina por dez segundos no vórtex, ou até homogeneizar a solução com a resina, obtendo uma consistência pastosa. Para uniformizar os resultados, deve-se manter a resina homogeneizada toda vez em que for utilizada.

C. Remover o microtubo do banho-maria, adicionando 250 µl de tampão lise e 7µl da resina. Agitar o microtubo no vórtex por dois segundos. Colocar na plataforma magnética, a resina irá para o lado do microtubo instantaneamente. Deve-se descartar cuidadosamente a solução sobrenadante, sem encostar na resina aderida ao lado do microtubo.

D. Adicionar mais 100µl do tampão lise ao microtubo, removendo o mesmo da plataforma magnética e agitando-o no vórtex por dois segundos.

E. Retornar o microtubo na plataforma magnética, descartando cuidadosamente todo o tampão lise.

F. Adicionar 100µl do Tampão de lavagem. Remover o microtubo da plataforma magnética e agitar no vórtex por dois segundos.

G. Retornar o microtubo na plataforma magnética, descartando cuidadosamente todo o tampão de lavagem.

H. Repetir os passos F e G mais duas vezes, para um total de três lavagens com o tampão preparado. Após a última lavagem, verificar se toda a solução foi eficazmente removida do microtubo.

I. Secar a resina dentro do microtubo com a tampa aberta na plataforma magnética durante cinco minutos. Não exceder o tempo de 20 minutos, pois isto pode inibir a separação da resina e do DNA.

J. Adicionar 25µl do Tampão de eluição (*Elution buffer*) ao microtubo com a resina.

K. Fechar a tampa, agitar no vórtex durante dois segundos e colocar em estufa a 65°C durante cinco minutos.

L. Remover o microtubo da estufa e agitar no vórtex durante dois segundos. Após isto, o microtubo deve ser imediatamente colocado na plataforma magnética.

M. Transferir cuidadosamente a solução com o DNA para um recipiente de escolha (microtubos de 1,5ml). Os fabricantes recomendam recipientes de polipropileno para reduzir a quantidade de DNA aderida nas paredes.

Nota: A solução com o DNA extraído pode ser armazenada em curto prazo estando a 4°C ou em longo prazo permanecendo a -20°C ou -70°C.

## ANEXO E

### REAGENTES E SOLUÇÕES PARA PCR

- Marcador de DNA de 50pb (Promega Corporation, Madison, WI, USA): consiste de 16 fragmentos de DNA que variam de 50pb a 800pb em graduações de exatamente 50pb, em uma solução de 10mM Tris-HCl pH 8,0 e 1mM EDTA, com uma concentração final de 340µg/ml. Para os experimentos, foram utilizados 5µl desta solução marcadora de DNA, que foi diluída em 150 µl de *Orange 6X loading dye* (15% Ficoll 400, azul de bromofenol 0,03%, xileno cianol 0,03%, 0,4% de corante *orange G*, 10mM Tris-HCl pH 7,5 e 50mM de EDTA), solução fornecida pelo fabricante que vem juntamente com o marcador.
- Solução estoque de acrilamida (30%): 29 gramas de acrilamida e 1 grama de bis-acrilamida diluídas em um volume final de 100ml de água. Dissolver a acrilamida e a bis-acrilamida em água e filtrar, para evitar resíduos.
- Glicerol: [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>(OH)<sub>3</sub>].
- Tampão TBE 10X: 108 gramas de Tris/HCl 0,9M pH 8,0; 40ml EDTA 0,08M; 53 gramas de ácido bórico 0,89M. Dissolver o ácido bórico em 500ml de água, colocar o EDTA e Tris.
- Persulfato de Potássio: Solução saturada em água (650mg/ 6,5ml de água deionizada q.s.p.).
- TEMED (tetrametiletilenodiamina).
- Tampão de amostra (*loading buffer*): TBE 1X; xileno cianol 0,25%; azul de bromofenol 0,25%; EDTA 0,1M pH 8,0; ficoll 15%.
- Composição utilizada para o gel de acrilamida 8%, para um volume final de 20ml: 5,3ml da solução estoque de acrilamida (30%), 1,4ml de glicerol, 11ml de água deionizada q.s.p., 2ml de tampão TBE 10X, 15µl de TEMED e 600µl de solução saturada de persulfato de potássio.

**Revelação, fixação e coloração do gel de poliacrilamida**

- Solução fixadora: 50ml de álcool etílico, 300ml de água deionizada q.s.p.
- Nitrato de prata: Solução a 0,1% em água destilada.
- Formaldeído 37%.
- Revelador: 4,5 gramas de NaOH, 200ml de água deionizada q.s.p. Adicionar 1ml de formaldeído 37% para cada 100ml de solução na hora do uso.

# 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](#)