



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Lucyana Conceição Farias

Influência da idade sobre parâmetros clínicos, genéticos e epigenéticos no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: um enfoque na metilação do gene P16^{CDKN2A}, polimorfismo DNMT3B (C46359T) e imunolocalização da proteína p53

Montes Claros

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Lucyana Conceição Farias

Influência da idade sobre parâmetros clínicos, genéticos e epigenéticos no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: um enfoque na metilação do gene P16^{CDKN2A}, polimorfismo DNMT3B (C46359T) e imunolocalização da proteína p53

Dissertação de Mestrado Acadêmico apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros/UNIMONTES, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Saúde Bucal
Linha de pesquisa: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães

Coorientador: Prof.Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula

Montes Claros

2009

F224i Farias, Conceição Lucyana.
Influência da idade sobre parâmetros clínicos, genéticos e epigenéticos no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço [manuscrito] : um enfoque na metilação do gene P16^{CDKN2A}, polimorfismo DNMT3B (C46359T) e imunolocalização da proteína p53 / Lucyana Conceição Farias. – 2009.

146 f. : il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde/ PPGCS, 2009.

Orientador: prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães.

Co-orientador: prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula.

1. DNMT3B. 2. Polimorfismo. 3. P16^{CDKN2A}. 4. Metilação. 5. Câncer de cabeça e pescoço. I. Guimarães, André Luiz Sena. II. Paula, Alfredo Maurício Batista de. III. Universidade Estadual de Montes Claros. IV. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Mestranda: Lucyana Conceição Farias

Título da Dissertação: Influência da idade sobre parâmetros clínicos, genéticos e epigenéticos no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: um enfoque na metilação do gene P16^{CDKN2A}, polimorfismo DNMT3B (C46359T) e imunolocalização da proteína p53

BANCA EXAMINADORA - TITULARES

ASSINATURAS

Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães (Orientador)

Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan

BANCA EXAMINADORA - SUPLENTES

ASSINATURAS

Prof^a. Dr^a. Alessandra Rejane Ericsson de Oliveira

Prof^a. Dr^a. Andréa Maria Eleutério de Barros Lima Martins

APROVADO

REPROVADO



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



Reitor

Paulo César Gonçalves de Almeida

Vice-Reitor

João dos Reis Canela

Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação

Sílvia Nietsche

Coordenador de Pós-Graduação

Hercílio Martelli Júnior

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Paulo Rogério Ferreti Bonan

Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

João Felício Rodrigues Neto

“Não acrediteis em coisa alguma apenas por ouvir dizer. Não acrediteis na fé das tradições só porque foram transmitidas por longas gerações. Não acrediteis em coisa alguma só porque é dita e repetida por muitos. Não acrediteis em coisa alguma pelo fato de vos mostrarem o testemunho escrito de algum sábio antigo. Não acrediteis em coisa alguma só porque as probabilidades a favorecem ou porque um longo hábito vos leva a tê-la como verdadeira. Não acrediteis no que imaginastes, pensando que um ser superior a revelou. Não acrediteis em coisa alguma com base na autoridade de mestres e sacerdotes. Aquilo, porém que se enquadrar na vossa razão, e depois de minucioso estudo for confirmado pela vossa própria experiência, conduzindo ao vosso próprio bem e ao de todas as outras coisas vivas, a isso aceitai como Verdade. E daí pautai a vossa conduta!”

Sidarta Gautama

“Essa longa história da vida que aos poucos se vai erguendo em escala ascensional é, precisamente, a história da criação do mundo dos viventes. É a ação de Deus que tudo planeja e concebe, dirige e sustenta”.

Fr. Von Huene

DEDICATÓRIA

A Deus, que tudo concebe, sustenta e renova.

À minha família, pelo seu amor incondicional, doação e
apoio.

Dedico a vocês todas as conquistas de minha vida!

A todos os amigos que me deram força, apoio e conforto necessário para superar
uma grande perda em vida, nessa fase em que eu precisei ser forte diante de tudo
para finalizar mais uma etapa da minha formação.

AGRADECIMENTOS

Foram tantas as ajudas e o empenho das pessoas envolvidas nesse trabalho que é com grande alegria, que venho agradecer especialmente a cada uma delas.

A DEUS que me concedeu a possibilidade de realizar esse sonho, dando-me sabedoria, discernimento e persistência. Agradeço por ter guiado os meus caminhos e ter colocado em minha vida pessoas que me deram tanto apoio nessa fase tão importante.

Aos meus pais, LUCY e EDUARDO (*in memorian*), pelo amor, ensinamentos e dedicação. Agradecer é pouco pela vida que vocês me deram!

Aos meus irmãos DENYSE, PATRÍCIA E ROBIM por terem compartilhado os meus sonhos.

Aos meus sobrinhos, por compartilharem comigo todas as minhas alegrias e vibrarem com minhas conquistas profissionais.

Ao meu namorado SANDRO, pelo amor, apoio e por ter me esperado diante de tantas ausências nesta fase importante. Suas palavras de confiança que tudo daria certo foram um apóio que tive diante de tantos obstáculos e tanta saudade.

À colega e amiga LUDMILLA pelo carinho, pelas conversas, pelos ensinamentos laboratoriais e pela amizade sincera. Você não imagina o quanto foi grandiosa a sua amizade!

Ao meu orientador, Prof. ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, pela confiança e paciência. Com você aprendi que sou capaz de ultrapassar barreiras; que posso fazer mais e melhor. Você foi fundamental para o meu crescimento profissional. O seu jeito meio agitado e extremamente exigente, que, no princípio, tanto me

assustou, com o tempo percebi a pessoa acessível, amiga e sempre empenhada em oferecer o melhor caminho para os seus alunos. Muito obrigada por tudo!

Ao meu coorientador Prof. ALFREDO MAURÍCIO BATISTA DE PAULA, por ter me incentivado desde a graduação a seguir pelos caminhos da ciência. Você foi um grande incentivo e estímulo para eu ter persistido!

A todos os integrantes do Laboratório de Pesquisa em Saúde - UNIMONTES, ÉRICA PATRÍCIA, ANA PAULA, LUCAS, ÉRICA, CAMILA, PATRÍCIA, FABIANO, LEANDRO, DANIEL, AGOSTINHO, CARLOS, MARCOS, CANDICE, SAHRA, GÉFTER, ERIVELTON, THIAGO FONSECA, CAROL e JOÃO. Agradeço a todos pelo apoio, amizade, convivência e paciência.

Aos colegas CARLOS e MARCOS, acadêmicos de Iniciação Científica, pela incansável dedicação à pesquisa.

Ao colega THIAGO FONSECA, pelo compromisso com as contagens celulares na etapa da técnica de imunistoquímica.

Ao Dr. FRANCIS e ao INSTITUTO DE PATOLOGIA DO NORTE DE MINAS, pela fundamental ajuda na concessão de arquivos dos pacientes em estudo.

À DO CARMO E KÁTIA, secretárias do Programa de Pós-graduação. Agradeço a atenção e presteza durante essa jornada.

À ROSINHA, funcionária do Laboratório de Parasitologia pela sua companhia e conselhos nas horas vagas.

A todos os PROFESSORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, pelos conhecimentos e empenho constante para o crescimento e consolidação do mestrado.

Aos COLEGAS do mestrado DANI, NAIARA, PEDRO, SCHEILA, MARIA FERNANDA, LUIZA, LUDMILLA, LÉO agradeço pelo coleguismo e momentos compartilhados. Vocês são ótimos amigos, ótimos colegas!

À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) e FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS (FAPEMIG) pelo apoio financeiro que possibilitou a execução do projeto. A CAPES agradeço, ainda, pela concessão de bolsa de estudo.

À UNIMONTES, instituição em que me graduei como odontóloga e me pós-graduei em Ciências da Saúde, agradeço pela minha formação como profissional e como pessoa, sempre seguindo os preceitos da Ética e de respeito pelo próximo.

A todos os FUNCIONÁRIOS DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO CLEMENTE DE FARIA por terem me acolhido nessa fase.

Aos professores avaliadores dos exames de qualificação e dissertação, DR^a. ALESSANDRA REJANE ERICSSON, HERCÍLIO MARTELLI JÚNIOR, DR^a. ANDRÉA MARIA ELEUTÉRIO DE BARROS LIMA MARTINS, DR. RICARDO SANTIAGO GOMEZ, DR. PAULO ROGÉRIO FERRETI BONAN, agradeço pelas valiosas sugestões para o enriquecimento da pesquisa.

Aos INDIVÍDUOS DE ESTUDO que mesmo anônimos, desconhecidos, doaram sua história de vida como fonte de pesquisa. Meu eterno agradecimento!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Metilação *de novo* do DNA é um mecanismo epigenético relevante que reprime a transcrição gênica e, comumente, inativa genes supressores de tumor no mecanismo da carcinogênese. O gene DNA-metiltransferase-3B (DNMT3B) desempenha um papel importante na metilação *de novo*; seu efeito oncogênico foi associado a vários tipos de câncer. O polimorfismo de nucleotídeo único C46359T no gene DNMT3B foi relacionado à modulação da susceptibilidade individual para a doença. No entanto, há uma escassez de estudos direcionados à investigação de suas variantes polimórficas em relação à metilação do gene P16^{CDKN2A} no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), cuja incidência mundial vem aumentando em adultos jovens. Diferenças na imunolocalização da proteína p53 são eventos marcantes no CECP. Este estudo caso-controle analisa uma possível influência da idade sobre parâmetros clínicos, genéticos e epigenéticos no CECP com um enfoque na metilação do gene P16^{CDKN2A}, polimorfismo DNMT3B (C46359T) e imunolocalização da proteína p53. Uma amostra de 75 indivíduos portadores de CECP, assistidos em centros de referência do norte do estado de Minas Gerais, foi categorizada de acordo com a idade, sendo 25 adultos jovens (≤ 45 anos) e 50 indivíduos clássicos ou idosos (> 45 anos). Estes foram pareados pelo tabagismo, etilismo e estadiamento clínico TNM. Uma amostra maior de 724 indivíduos portadores de CECP, com a mesma categorização e pareamento, foram analisados quanto aos parâmetros clínico-patológicos e moleculares. O polimorfismo DNMT3B (C46359T) foi demonstrado através da técnica PCR-RFLP, utilizando a Bln1 como enzima de restrição. A técnica PCR-MSP foi executada para definição do *status* da metilação do gene P16^{CDKN2A}. A técnica de imunistoquímica foi realizada para identificação das proteínas p53 e DNMT3b. A análise estatística pelo teste X^2 revelou que a metilação do gene P16^{CDKN2A}, em pacientes clássicos, foi associada ao tabagismo ($p=0,002$) e, em adultos jovens, foi associada ao gênero ($p=0,044$) e história de câncer na familiar (0,032). O polimorfismo DNMT3B (C46359T) foi significativamente diferente em comparação ao estadiamento clínico TNM ($p=0,043$) e tamanho do tumor ($p=0,001$) em pacientes clássicos. Nenhuma associação em relação ao polimorfismo foi observada em adultos jovens. Além disso, este polimorfismo genético mostrou uma tendência para associação com o tabagismo em pacientes clássicos. Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre o polimorfismo DNMT3B (C46359T) e a metilação do gene P16^{CDKN2A}, entre indivíduos jovens e clássicos, sugere-se a ocorrência de diferenças nos mecanismos moleculares do CECP, considerando o fator idade. Não foi identificada diferenças na imunolocalização da proteína DNMT3b. A proteína p53 apresentou maior imunomarcagem em jovens ($p=0,04$). A análise de sobrevida não mostrou diferença entre os grupos, considerando a amostra de 75 indivíduos. No entanto, considerando a amostra de 724 indivíduos, revelou que o parâmetro metástases cervicais foi associado a um pior prognóstico tanto em jovens como em indivíduos em faixa etária mais avançada ($p<0,05$). Identificou-se, no entanto, que o polimorfismo DNMT3B (C46359T) ou metilação do gene P16^{CDKN2A}, analisados separadamente, impactou em diferentes parâmetros clínicos quando os pacientes foram categorizados pela idade. Assim, mais estudos são necessários para esclarecer se a idade é um fator que interfere na etiopatogênese e no comportamento do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: DNMT3B; polimorfismo; P16^{CDKN2A}; metilação; câncer de cabeça e pescoço.

ABSTRACT

De novo DNA methylation is a relevant epigenetic mechanism, which represses gene transcription and commonly to inactivate tumor suppressor genes in carcinogenesis. DNA-methyltransferase-3B (DNMT3B) plays a substantial role in *de novo* DNA methylation, and its oncogenic effect has been associated for several cancers. Single nucleotide polymorphism of DNMT3B, C46359T (-149C>T) was reported to modulate individual's susceptibility to cancers. However, studies have investigated the role of their polymorphic variants in regard to methylation status of the P16^{CDKN2A} gene in squamous cell carcinoma of the head and neck cancer (HNSCC), whose incidence is increasing in younger adults. Differences in the immunolocalization of tumor suppressor p53 protein are significant events in the HNSCC. This case-control study examines a possible influence of age on clinical, genetic and epigenetic parameters in HNSCC with a focus on methylation of the gene P16^{CDKN2A}, DNMT3B polymorphism (C46359T) and immunolocalization of p53 protein. 75 HNSCC patients categorized according to age, being 25 younger patients (≤ 45 years) and 50 older patients (>45 years) which were matched to smoking, alcohol intake and TNM clinical staging. A larger sample of 724 HNSCC individuals, with same categorization and matching, were analyzed for clinicopathological and molecular parameters. DNMT3B (C46359T) polymorphism was revealed by PCR-RFLP using Bln1 restriction enzyme. PCR-MSP was executed to definition of P16^{CDKN2A} methylation status. Technique of immunohistochemistry was performed for identification of p53 and DNMT3b proteins. Statistical analysis by χ^2 -test revealed that P16^{CDKN2A} methylation in older patients was associated with smoking status ($p=0,002$) and, in younger patients, it was associated with gender ($p=0,044$) and family history of cancer ($p=0,032$). DNMT3B (C46359T) polymorphism was significantly different compared to TNM clinical staging ($p=0,043$) and tumor size ($p=0,001$) in the older patients. No association was noted in younger patients. In addition, this genetic polymorphism showed a trend for association between smoking status in old patients. Although no difference between DNMT3B (C46359T) polymorphism and P16^{CDKN2A} methylation were observed in younger and older patients, we suggested that have differences in molecular mechanisms between younger and older with HNSCC. No difference in the immunolocalization of DNMT3b protein was observed between groups. A significantly higher expression of p53 protein was found in HNSCC in young ($p = 0.04$). No differences in survival were observed comparing these groups, in sample of 75 HNSCC individuals. However, considering the sample of 724 individuals showed that cervical metastasis parameter was associated with worse prognosis in both young and older subjects ($p<0,05$). Here, we observed that DNMT3B (C46359T) polymorphism or P16^{CDKN2A} methylation, analyzed separately, impacted in different clinical parameters when patients were categorized by age. In conclusion, more studies are necessary to clarify if younger and older HNSCC are distinct or not in their etiology and behavior.

Key Words: DNMT3B; polymorphism; P16^{CDKN2A}; methylation; head and neck cancer.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μ l	Microlitro
μ m	Micrômetro
CCE	Carcinoma de células escamosas
CDC	Cinase dependente de ciclina
CECP	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
CpG	Dinucleotídeo citosina-guanina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA-metiltransferase
DNMT1	DNA-metiltransferase-1
DNMT3B	DNA-metiltransferase-3B
EBV	do Inglês: " <i>Epstein-Baar Virus</i> " Traduzido: <i>Epstein-Baar</i> vírus
F	Forward
HE	Hematoxilina e eosina
HPV	do inglês: " <i>Human Papiloma Virus</i> " Traduzido: Papiloma vírus humano
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MeCP	Proteína de ligação metil-CpG
Min	Minuto
mM	Milimolar
Ng	Nanograma
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pmol	Picomol
R	Reverse
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
SAH	S-adenosil-metionina
SAM	S-adenosil-hemocisteína

siRNA	do Inglês: "small interfering RNA" Traduzido: pequeno RNA de interferência
SNP	do Inglês: "single-nucleotide polymorphism" Traduzido: Polimorfismo de nucleotídeo único
<i>Taq</i> DNA polimerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerase
VNTR	Polimorfismo de número variável de repetições em tandem

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura1.	Mecanismo de inativação bi-alélica de gene supressor de tumor.....	25
Figura 2.	Metilação da citosina.....	28
Figura 3.	Mecanismo de inibição da transcrição gênica através da metilação do DNA.....	29
Figura 4.	Estrutura da cromatina ativa e inativa na região promotora do gene....	30
Figura 5.	Esquema da metilação de manutenção.....	31
Figura 6.	Esquema da metilação <i>de novo</i>	31
Figura 7.	Representação esquemática da localização do gene P16 ^{CDKN2A} no cromossomo 9 humano.....	34
Figura 8.	Representação esquemática da localização do gene DNMT3B no cromossomo 20 humano.....	39
Figura 9.	Representação esquemática da localização do gene TP53 no cromossomo 17 humano.....	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço	16
1.1.1 Aspectos Gerais	16
1.1.2 Dados Epidemiológicos	19
1.1.3 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em indivíduos jovens	21
1.1.4 Etiopatogênese do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	23
1.2 Metilação do DNA	27
1.2.1 Metilação do gene P16 ^{CDKN2A}	34
1.3 Polimorfismos genéticos.....	37
1.3.1 Polimorfismo genético DNMT3B (C46359T)	39
1.4 O gene supressor de tumor TP53	42
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo Geral	44
2.2 Objetivos Específicos	44
3 METODOLOGIA.....	46
4 PRODUTOS ALCANÇADOS	47
4.1 Artigo científico I.....	47
4.1 Artigo científico II.....	73
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
REFERÊNCIAS	95
ANEXOS.....	95
ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/UNIMONTES	95

ANEXO II - Termo de autorização do Instituto de Patologia do Norte de Minas.....	96
APÊNDICE	97
APÊNDICE I - Desenho dos <i>primers</i> DNMT3B	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

1.1.1 Aspectos Gerais

Câncer de cabeça e pescoço é um termo coletivo, definido em bases anatômico-topográficas, utilizado para descrever tumores malignos do trato aerodigestivo superior. Esta região anatômica inclui a cavidade bucal, faringe e laringe. O principal subgrupo dos carcinomas de cabeça e pescoço refere-se ao câncer bucal, acometendo lábio, língua, gengiva, soalho bucal e palato. Destaca-se, ainda, o câncer de faringe, compreendendo orofaringe, hipofaringe e nasofaringe. Outros tumores identificados nessa região, tais como os tumores cerebrais, de tireóide e os melanomas não são incluídos nessa classificação (1, 2). Neoplasias malignas de glândulas salivares maiores, tonsilas e carcinoma nasofaríngeo, muitas vezes, são excluídas da categoria câncer de cabeça e pescoço devido à etiologia distinta dos demais, além de possuir tipos histológicos diferenciados (1).

O carcinoma epidermóide, também conhecido como carcinoma de células escamosas (CCE), é a neoplasia maligna de células epiteliais que mais acomete a região de cabeça e pescoço, em diferentes sítios anatômicos. Deriva-se do epitélio escamoso ou exibe características morfológicas deste. O CCE é frequentemente o estágio final de alterações no epitélio escamoso estratificado, que se inicia como uma displasia epitelial e progride até que as células do epitélio displásico rompam a membrana basal e invadam o tecido conjuntivo adjacente. Algumas vezes, o CCE pode originar diretamente (*de novo*) de um epitélio de revestimento estratificado, não apresentando a fase de lesão potencialmente cancerizável (3, 4).

Nos estágios iniciais, o CCE pode se apresentar como placas firmes e elevadas ou mostrar-se como áreas irregulares, ásperas ou verrugosas do espessamento da mucosa, possivelmente confundidas com leucoplasia. Ambos os padrões podem se sobrepor a uma base de leucoplasia ou eritroplasia aparente. Com a progressão da lesão, esta pode apresentar aspecto nodular ou infiltrativo, este último caracterizado por uma úlcera irregular e áspera, assintomática, com bordas elevadas, firmes e onduladas (5). O CCE tem um crescimento infiltrativo profundo no tecido conjuntivo adjacente, muitas vezes, com poucas alterações na superfície do epitélio; pode se apresentar como uma área endurecida com perda da mobilidade do tecido. No assoalho da cavidade bucal, essa lesão comumente causa a fixação da língua ou impedimento da abertura normal da boca. (4,5).

O principal determinante para que a doença apresente um elevado índice de mortalidade é o estágio clínico avançado em a doença é diagnosticada (6). O diagnóstico precoce do câncer pode ser difícil por ser assintomático, nas fases iniciais; lesões precoces são raramente identificadas pela maioria dos profissionais de saúde (7).

A carcinogênese da região de cabeça e pescoço tem sido vastamente estudada quanto às suas características clínico-patológicas, biologia e comportamento das células neoplásicas, além da investigação de fatores preditivos para o prognóstico. As regiões mais invasivas do tecido neoplásico apresentam maior grau de anaplasia celular e interações moleculares relacionadas aos processos de invasão tumoral e ao desenvolvimento de metástases regionais. O sistema de gradação morfológica do *front* de invasão tumoral, que avalia as áreas mais invasivas de tecido neoplásico, tem-se mostrado de grande valor preditivo para o prognóstico da doença (8).

O valor prognóstico de vários marcadores biológicos tumorais relacionados ao câncer de cabeça e pescoço tem sido vastamente pesquisado, destacando a investigação de marcadores de proliferação celular, oncoproteínas, proto-oncogenes, genes supressores de tumor e, mais recentemente, genes envolvidos em modificações epigenéticas. Evidências clínicas, muitas vezes, não são relevantes para prever uma resposta ao tratamento do câncer de cabeça e pescoço. Assim, diversas pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de se obter um maior entendimento da biologia e comportamento da doença, bem como para a descoberta de novos fatores de prognóstico que poderiam ser utilizados nas decisões de tratamento e na predição de resposta às diferentes modalidades de terapia oncológica (9, 10, 11, 12, 13).

1.1.2 Dados Epidemiológicos

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade em vários países do mundo, correspondendo ao 6º tipo de câncer mais comum. Mais de 90,0% dos tumores na região de cabeça e pescoço são carcinomas de células escamosas do epitélio de revestimento, representando uma das malignidades mais frequentes, com maiores taxas de acometimento em indivíduos tabagistas e etilistas (1, 2).

Dados epidemiológicos na população mundial apontam para uma estimativa de 650.000 casos incidentes de câncer e 350.000 de mortes devido à doença. Estima-se que aproximadamente 6,0% dessas estimativas ocorram, anualmente, na região de cabeça e pescoço (14), incluindo as neoplasias malignas originadas em seios paranasais, cavidade nasal, cavidade bucal, faringe e laringe (15). Cerca de 40% dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade bucal, 15% na faringe, 25% na laringe e, o restante, nos demais sítios remanescentes (glândulas salivares, tireóide) (1).

No Brasil, de acordo com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no período entre os anos de 2.008 e 2.009, ocorrerão aproximadamente 466.730 novos casos de câncer. Em exceção ao câncer de pele do tipo não-melanoma, no gênero masculino, os tipos mais frequentes são o de próstata e pulmão, ao passo que, em mulheres, as taxas percentuais são mais elevadas para o câncer de mama e de colo de útero, seguindo o mesmo perfil de magnitude observado no parâmetro mundial. A doença, incluindo todas as neoplasias, é a segunda causa de morte no país, precedida por doenças cardiovasculares. Há uma escassez de referências epidemiológicas, na população brasileira, no que se refere às estimativas do câncer de cabeça e pescoço. Os registros populacionais do INCA fazem referência aos

tumores de cavidade bucal, apresentando uma incidência de 14.000 novos casos no período supracitado. Sugere-se que o câncer de laringe seja um dos mais comuns a atingir a região da cabeça e pescoço, representando cerca de 25,0% dos tumores malignos que acometem esta área e 2% de todas as doenças malignas (16). Entretanto, estudos apontam que a cavidade bucal seja o sítio mais acometido em um grupo de brasileiros (17). O câncer bucal é o 6º tipo de câncer mais comum em homens e o 7º em mulheres (16).

As neoplasias malignas, de maneira geral, acometem indivíduos do gênero masculino, entre a 6ª e 7ª décadas de vida, associado ao tabagismo e etilismo (18,2). Entretanto, tem-se observado, no parâmetro mundial, um aumento na incidência de câncer de cabeça e pescoço em faixas etárias cada vez mais precoces, afetando adultos jovens com idade inferior a 45 anos (19, 20, 21). Alguns estudos destacam um aumento do número de casos de mulheres acometidas pela doença e, também, o desenvolvimento do câncer em indivíduos com ausência de hábitos tabagistas ou etilistas, sendo estes, fatores de risco notadamente estabelecidos para a doença (18, 20).

1.1.3 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em indivíduos jovens

Não há um consenso na literatura para a idade limite entre adultos jovens e indivíduos idosos. No entanto, sugere-se 45, ou até mesmo 40 anos, para essa categorização de acordo com a idade. Esse parâmetro etário é amplamente utilizado na medicina para diversas neoplasias e, também, em doenças não-neoplásicas. Enfatizando o câncer de cabeça e pescoço, foi utilizada a terminologia 'indivíduos clássicos ou típicos' em substituição à 'indivíduos idosos' (22). Essa distinção utilizada na literatura, entretanto, não equivale àquela adotada pela Organização Mundial da Saúde e, também, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em levantamentos demográficos, em que um indivíduo é considerado 'idoso' com idade superior a 60 anos (23). Sugere-se aqui a utilização da terminologia 'indivíduos clássicos'.

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em adultos jovens é uma neoplasia pouco comum que, atualmente, tem sido alvo de estudo (22, 24, 25, 26). Estima-se que apenas 4 a 6% dos casos ocorram em indivíduos com idade inferior a 40 anos; a incidência da doença, no entanto, vem aumentando em vários países (20, 27, 28).

Não há um conhecimento preciso sobre os mecanismos envolvidos na carcinogênese, bem como as características clínicas da doença em faixas etárias precoces (29). Evidências sugerem que a carcinogênese em adultos jovens é um mecanismo distinto da doença e, muitas vezes, não está associado a fatores de risco clássicos para o câncer de cabeça e pescoço (20). Alguns estudos, no entanto, sugerem que o aumento na incidência está associado a uma elevada exposição ao tabaco e consumo de bebidas alcoólicas (30, 31, 32). Infecção precoce pelo *Papiloma Virus Humano* (HPV) pode estar relacionada ao câncer de cabeça e

pescoço em adultos jovens (33, 34). A oncoproteína E7 derivada do vírus pode levar à inibição de importantes genes supressores de tumor, como gene P16 (35).

A doença foi associada a um pior prognóstico em indivíduos com idade inferior a 45 anos, podendo ser resultado de um caráter mais agressivo da neoplasia (26, 36). Entretanto, o perfil do prognóstico tem mostrado resultados conflitantes (21, 37, 38).

1.1.4 Etiopatogênese do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é uma doença multifatorial, sendo sua etiopatogênese relacionada à susceptibilidade individual, destacando alterações genéticas, epigenéticas e mecanismos imunológicos. Agentes ambientais, tais como exposição à radiação ultravioleta e a poluentes industriais (4,5), além de fatores relacionados ao estilo de vida, como dieta, hábitos tabagistas e etilistas representam fatores de risco importantes que podem influenciar nos mecanismos da carcinogênese (39). Infecções virais, enfatizando o *Papiloma Virus Humano* (HPV) e o *Epstein-Baar Virus* (EBV), têm sido associadas à etiopatogênese e risco para alguns tipos de câncer (40, 41). O HPV, vírus classicamente definido como agente envolvido no câncer cervical (42), foi associado ao câncer pulmonar (43) e ao câncer de cabeça e pescoço (44). Já, o EBV possui uma evidente associação com carcinomas nasofaríngeos na região de cabeça e pescoço (32, 45).

Classicamente, a etiopatogênese do câncer está relacionada a alterações genéticas progressivas (3, 10, 46). Entretanto, evidências indicam que, não somente, fatores genéticos, mas também modificações epigenéticas, são similarmente relevantes e estão intrinsecamente associadas à ruptura dos mecanismos de sinalização celular relacionados à carcinogênese (47, 48).

Em contraste a alterações de base genética, as modificações epigenéticas são processos que podem alterar a expressão gênica sem, no entanto, modificar a sequência dos nucleotídeos; podem ser herdáveis no genoma durante a divisão celular. Por não alterar a sequência do DNA, essas modificações podem ser reversíveis (49, 50). Essas características fazem desses mecanismos alvos atrativos para intervenções terapêuticas em relação ao câncer (51). Metilação do DNA e

deacetilação de histonas correspondem às principais modificações epigenéticas em humanos (52).

Metilações aberrantes, especialmente na região promotora de genes relacionados ao controle do ciclo celular, podem exercer um papel fundamental no desenvolvimento de vários tipos de câncer através de mecanismos de silenciamento gênico (53, 54, 55, 56).

Além de alterações no padrão de metilação de genes supressores de tumor, vários genes polimórficos podem, também, estar relacionados ao desenvolvimento do câncer. O polimorfismo do gene DNMT3B, responsável pela metilação, possivelmente, está associado a um risco aumentado para o câncer de cabeça e pescoço (57, 58, 59).

Os eventos moleculares mutagênicos geram instabilidade genética e aumentam a probabilidade de transformações neoplásicas. Esses eventos podem surgir em decorrência da ação de agentes químicos (carcinógenos), físicos (radiação ionizante), biológicos (60) e também, de alterações que surgem espontaneamente (3). Alterações genéticas no câncer incluem mutações pontuais, ampliações, rearranjos e deleções em proto-oncogenes e genes supressor de tumor (61, 62). A consequência desses danos genéticos é a desregulação celular com a ruptura da sinalização, de crescimento e/ou no mecanismo de reparo a danos celulares ou da eliminação de células alteradas (3). O aumento da função de oncogenes, bem como a inibição da função dos genes supressores de tumor, como os genes P16^{CDKN2A} e TP53, estão envolvidos na carcinogênese. A desregulação de oncogenes pode ocorrer através de amplificação gênica, translocações e ativação de mutações pontuais. E, genes supressores de tumor podem ser inativados pela perda total de cromossomos, deleções e, também, por mutações pontuais (63).

Considerando a estrutura alélica do gene, os dois alelos podem ser inativados por uma combinação de eventos genéticos e epigenéticos. Se um dos alelos é metilado, o outro pode ser inativado por metilação, deleção ou mutação pontual (Figura 1). A inativação funcional dos genes não ocorre em uma sequência específica de eventos; uma mutação pontual pode ser o primeiro evento seguido por metilação (64).

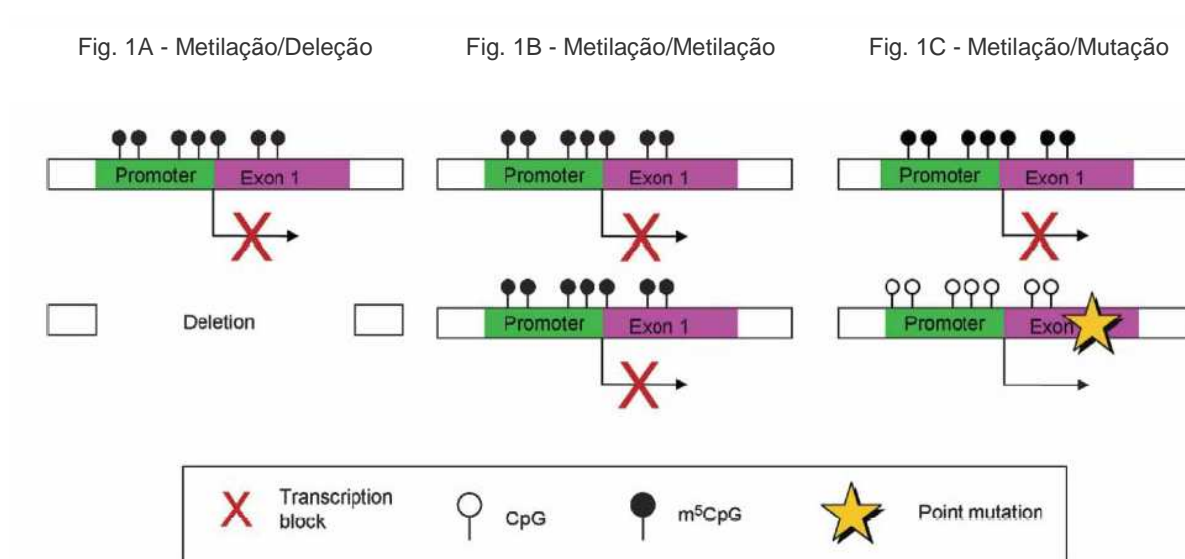


Figura 1. Mecanismo de inativação bi-alelica de gene supressor de tumor. A figura 1A mostra o silenciamento gênico, através de metilação/deleção dos alelos. A figura 1B mostra a ocorrência de metilação em ambos os alelos. Na figura 1C, a ocorrência de metilação/mutação.

Fonte: Grønbaek *et al.*, 2007⁶⁴

Considerando os fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço, estudos mostram que indivíduos tabagistas apresentam um risco aumentado para a doença; o etilismo pode exercer um efeito sinérgico, exacerbando, assim, o risco para o desenvolvimento do câncer (4, 5). O tabagismo e o etilismo estão implicados

em 75% de todos os cânceres de cabeça e pescoço (65, 66). Nesse processo, os constituintes químicos do tabaco, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, podem danificar, de forma irreversível, o DNA de indivíduos tabagistas e levar a um bloqueio da transcrição de genes importantes, como aqueles envolvidos no controle do ciclo celular, e iniciar a carcinogênese, caso não ocorra o reparo do DNA pela excisão de nucleotídeos alterados (67, 68). Portanto, genes de reparo de DNA exercem uma função essencial nos mecanismos da carcinogênese; uma capacidade reduzida de reparo do DNA está associada com o risco aumentado para o câncer induzido por agentes ambientais (69, 70).

Apesar da importância dos fatores de risco, alguns cânceres na região de cabeça e pescoço podem se desenvolver na ausência de fatores de risco associados, o que sugere um papel importante da susceptibilidade do hospedeiro. Apesar de evidências consistentes sobre a importância das alterações moleculares na etiopatogênese do câncer, a quase totalidade das estratégias para o diagnóstico, prognóstico e terapêutica ainda não são definidas através de tais evidências (3, 63).

1.2 Metilação do DNA

A adição do radical metil (CH_3) em regiões específicas do DNA contendo predominantemente nucleotídeos citosina denomina-se metilação. Esse mecanismo é um dos principais eventos epigenéticos no DNA humano exercendo funções importantes no controle da atividade gênica, desenvolvimento embrionário (71), inativação do cromossomo-X e regulação de genes envolvidos no controle do ciclo celular, genes de reparo de DNA e apoptose, além de ser um processo essencial para o desenvolvimento normal de mamíferos (72).

Em 1948, foi descoberta a 5'metil-citosina (73). Esta corresponde a uma citosina metilada, isto é, possui um grupamento metil adicionado na posição 5 do anel pirimídico. Porém, nem toda citosina presente no genoma pode ser metilada. Para que ocorra o processo de metilação é necessário que a citosina esteja na sequência 5'-CG-3', conhecido como dinucleotídeo CpG, onde se observa o nucleotídeo citosina seguido pela guanina, unidos entre si por uma ligação fosfodiéster (74). Os dinucleotídeos CpG estão distribuídos heterogeneamente no genoma, encontrando-se principalmente em regiões de DNA altamente repetitivo e heterocromatina (75), e na maioria das vezes, cerca de 80%, estão altamente metilados. No entanto, existem regiões no genoma ricos em CpG, que normalmente não estão metilados ou estão metilados em baixa frequência. Trata-se de pequenas regiões do DNA variando entre 0,5 a 5 Kb, ocorrendo em média a cada 100 Kb, conhecidas como ilhas CpG. Normalmente são encontradas nas extremidades 5' dos genes, em geral na região promotora, podendo se estender para o interior do primeiro éxon. Entretanto, nem todas as ilhas CpG localizam-se na região promotora do gene; algumas podem ser encontradas no interior de éxons e íntrons (76).

Na grande maioria das vezes, a metilação ocorre em regiões promotoras e éxons, onde há presença de dinucleotídeos CpG (48, 71, 77, 78). Resíduos de citosinas no DNA são convertidos em 5'-metil-citosina pela ação de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs). O grupo metil é doado pelo S-adenosil-metionina (SAM), que é então convertido em S-adenosil-homocisteína (SAH) (Figura 2) (64).

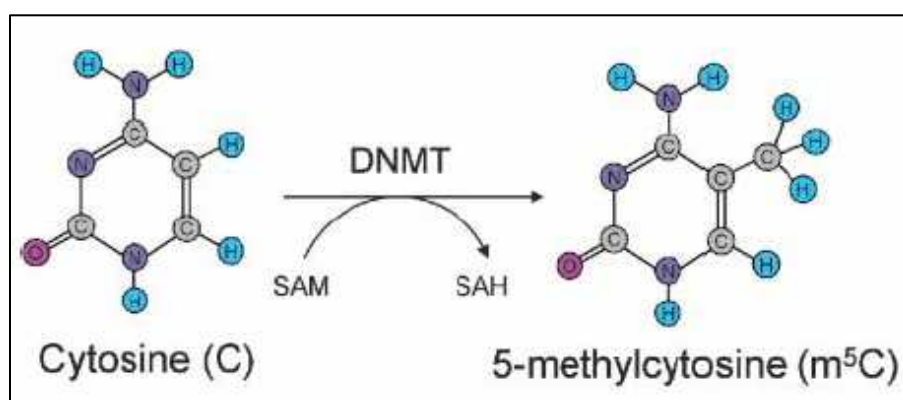


Figura 2. Metilação da citosina.

Fonte: Grønbaek *et al.*, 2007⁶⁴

Uma maior frequência de citosinas na região promotora intensifica o processo da metilação, podendo levar a um estado de silenciamento gênico. A CpG metilada pode reprimir a transcrição diretamente pela inibição de fatores de transcrição ligados ao DNA e também, indiretamente, recrutando proteínas que ativam a enzima histona deacetilase, responsável por possuir complexos repressores do DNA metilado (Figura 3) (71, 77, 78, 79).

O mecanismo preciso pelo qual a metilação reprime a transcrição não é bem estabelecido. Algumas teorias sugerem que a metilação interfere na ligação de fatores de transcrição em sequências regulatórias do DNA; outra teoria relacionada

ao silenciamento gênico através da metilação é a modificação da estrutura da cromatina que bloqueia o acesso dos fatores de transcrição e, também, através da afinidade de ligação do DNA metilado a proteínas que suprimem a expressão gênica, como as proteínas de ligação metil-CpG, destacando MeCP1 e MeCP2. Nesse processo de silenciamento gênico, não só a metilação exerce uma influência; a deacetilação da proteína histona também influencia sobremaneira no mecanismo de modificação da estrutura da cromatina. A deacetilação das histonas é um mecanismo responsável por remover grupos acetil, levando ao envelhecimento do DNA; este, uma vez condensado em torno das histonas, compromete a ligação aos fatores de transcrição, podendo, assim, impedir a transcrição gênica. As citosinas metiladas tendem a recrutar histonas deacetilases favorecendo a condensação do DNA (Figura 4) (80, 81, 82).

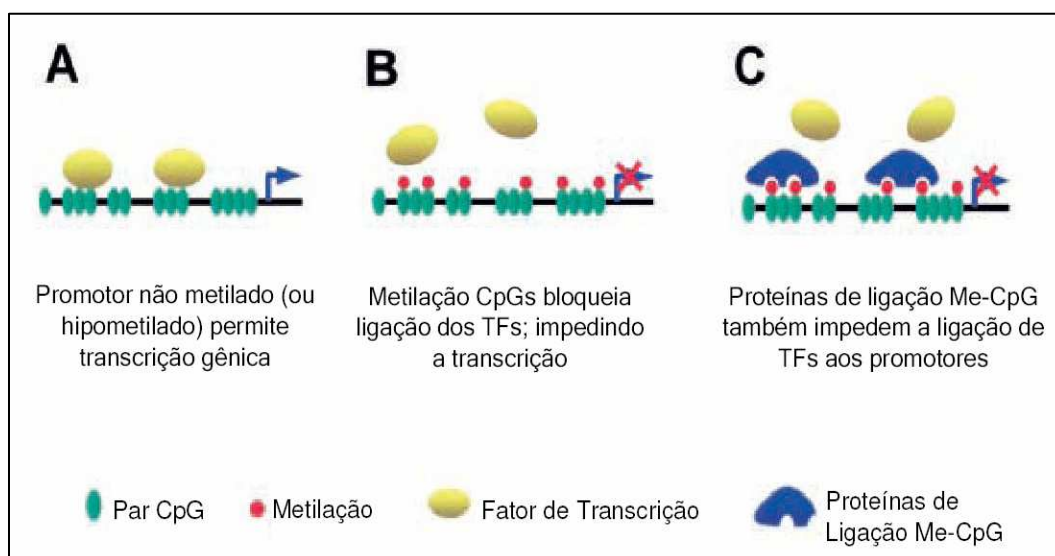


Figura 3. Mecanismo de inibição da transcrição gênica através da metilação do DNA. Na figura 3A, CpG não metilado permite a ligação do DNA à fatores de transcrição (FTs) favorecendo a transcrição gênica. Já na figura 3B, a transcrição é comprometida pela metilação dos CpGs, que bloqueia a ligação dos FTs ao DNA. A figura 3C mostra o bloqueio da transcrição, através da afinidade do DNA metilado a proteínas de ligação Me-CpG, que também impedem a ligação de TFs aos promotores.

Fonte: Attwood *et al.*, 2002⁸²

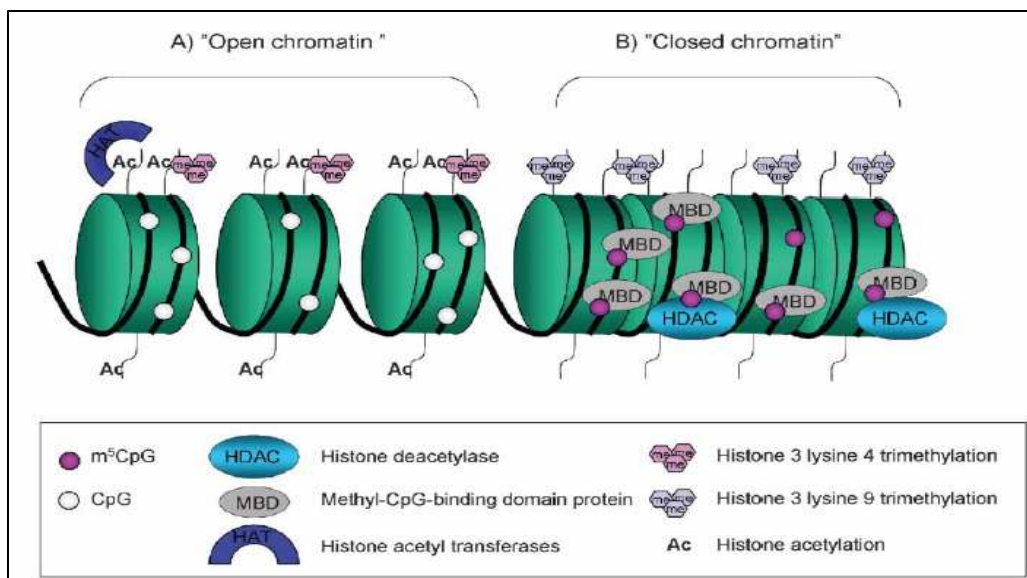


Figura 4. Estrutura da cromatina ativa e inativa na região promotora do gene. A) Cromatina ativa na transcrição é caracterizada por citosinas não-metiladas e histona terminal acetilada. Lisina 4 na histona H3 é trimetilada. B) Quando as citosinas tornam-se metiladas, elas se ligam a domínios protéicos MBDs que atraem histonas deacetilases (HDACs), os quais removem grupos acetil da histona terminal. O DNA se enovela sob a forma de uma estrutura da cromatina 'fechada', carreando o marcador de silenciamento lisina 9 trimetilada da histona 3. Esse mecanismo compromete a transcrição gênica.

Fonte: Grønbaek *et al.*, 2007⁶⁴

No mecanismo da metilação do DNA, três formas ativas de DNMTs foram identificadas em células de mamíferos, incluindo uma enzima de manutenção, a DNMT1, e duas enzimas que favorecem o processo da metilação *de novo*, destacando a DNMT3A e DNMT3B (83). Embora tais enzimas atuem cooperativamente para estabelecer um padrão de metilação genômico, funções específicas são executadas pelas DNMTs. A metilação de manutenção, realizada pela DNMT1, ocorre, preferencialmente, pela adição de grupamentos metil a citosinas do DNA hemi-metilado, subsequente à replicação do DNA (Figura 5) (84, 85, 86). Já o processo da metilação *de novo*, realizado pela DNMT3A e DNMT3B, ocorre pela metilação do DNA não-metilado e hemi-metilado, com igual eficiência (Figura 6) (87).

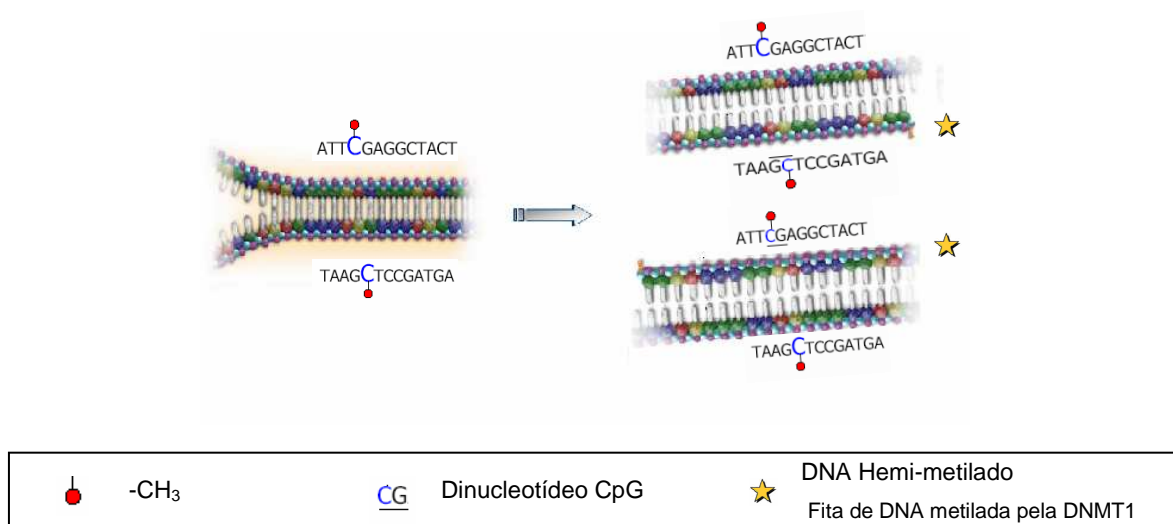


Figura 5. Esquema da metilação de manutenção. As duas fitas de DNA, inicialmente metiladas, irão dar origem a duas cópias hemi-metiladas. A enzima DNMT1 favorece a adição do radical metil (CH₃) ao DNA hemi-metilado, subsequente à replicação, favorecendo a manutenção de um padrão inicial de metilação. Os CH₃ se ligam aos dinucleotídeos CpG (CG).
 Fonte: adaptado de Luczak e Jagodzinsky, 2006⁸⁶

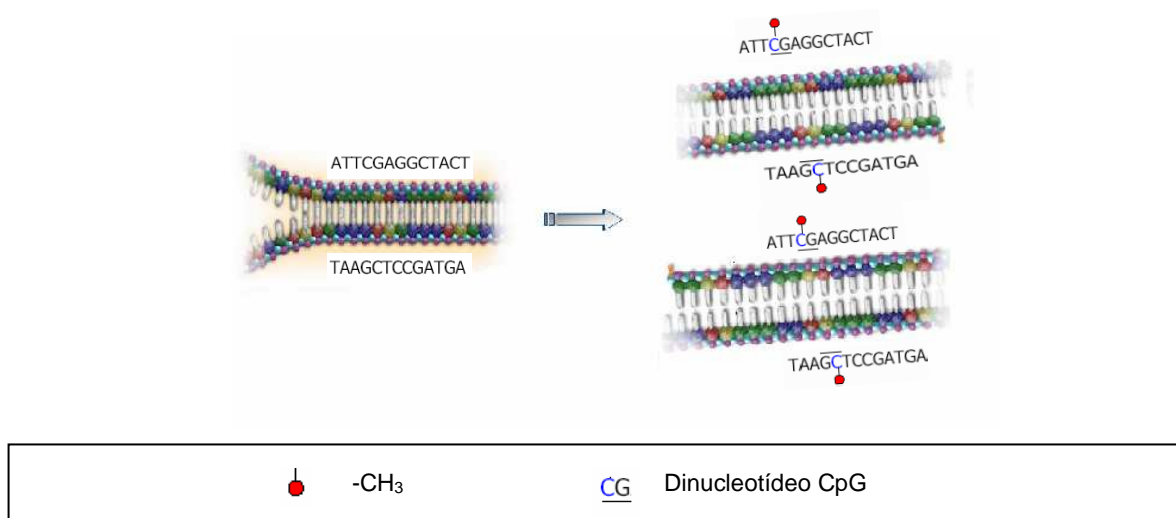


Figura 6. Esquema da metilação *de novo*. As duas fitas de DNA não-metiladas, irão dar origem, a duas cópias não-metiladas. Durante a replicação, as enzimas DNMT3A e DNMT3B podem estabelecer um novo padrão de metilação, adicionando radicais metil (CH₃) às fitas de DNA não-metiladas. Os CH₃ se ligam aos dinucleotídeos CpG (CG).
 Fonte: adaptado de Luczak e Jagodzinsky, 2006⁸⁶

O processo que inicia a metilação *de novo* ainda não é conhecido; entretanto, em plantas, é descrita uma relação com o mecanismo do RNA de interferência (siRNA), que pode ter como alvo a região promotora do gene e iniciar o processo de metilação das ilhas CpG (72). No entanto, não foi identificado se um mecanismo similar ocorre nas células de mamíferos.

Embora as modificações derivadas da metilação da citosina sejam pouco frequentes, elas podem ocasionar mutações (77). Tem sido proposto que modificações epigenéticas podem ser eventos iniciais na carcinogênese, enquanto alterações genéticas podem ser a consequência da ruptura de um estado epigenômico. Dessa forma, a metilação pode estar envolvida tanto na causa como na consequência do processo carcinogênico (78). Além disso, a frequência de metilações ou mutações genéticas variam entre os genes. Essas variações podem resultar em diferentes tipos tumorais, além de importante influência no prognóstico (88).

Metilações vêm sendo associadas ao desenvolvimento de cânceres através da inativação transcricional de genes supressores de tumor (48, 71, 89). O padrão de metilação já foi associado ao câncer de pulmão (48, 89), adenocarcinoma pulmonar (90), carcinoma epidermóide da cavidade bucal (91) e carcinoma de cabeça e pescoço (92). Além da hipermetilação, a hipometilação também pode ocasionar o desenvolvimento do processo da carcinogênese, pelo mecanismo de ativação indevida de oncogenes e proto-oncogenes (93).

Estudos revelaram que tanto a hipometilação global do DNA com a hipermetilação regional ocorre na carcinogênese (47), sugerindo que uma metilação inadequada pode contribuir para a iniciação e progressão do câncer. Em alguns tumores identifica-se uma hipermetilação regional das ilhas CpG associada à região

promotora de genes supressores de tumor, podendo levar à inativação funcional desses genes. A metilação dos dinucleotídeos CpG situados na região promotora do gene, geralmente, está associada ao silenciamento transcricional (71).

Os fatores que influenciam a expressão das DNMTs em células humanas não é claramente determinado. Acredita-se que idade pode alterar o padrão de metilação do DNA. No entanto, não são bem entendidos os mecanismos pelo qual este fator leva a um aumento ou redução da metilação do DNA. Não há um consenso sobre o real efeito da idade sobre a metilação (94, 95, 96). Além disso, a idade, influenciada pela diminuição do consumo de folato na dieta e consumo de álcool, pode alterar a metilação. O gênero também pode ser um fator importante que influencia no processo (95, 97). Embora não haja uma evidência precisa da relação entre tabagismo e metilação do DNA, pesquisas têm associado à ocorrência de metilação do DNA à exposição a fatores carcinogênicos do tabaco (98, 99).

1.2.1 Metilação do gene P16^{CDKN2A}

O gene supressor de tumor P16^{CDKN2A}, também conhecido como INK4A, CDK41 ou MTS1, localizado no cromossomo humano 9p21, é composto por três éxons e codifica uma proteína de 15,6 kDa com 158 aminoácidos (Figura 7). Essa proteína, conhecida como p16, pertence a uma família de inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CDC). A p16 liga-se especificamente às cinases dependentes de ciclinas -4 e -6 evitando, assim, a formação de um complexo protéico com as ciclinas D1, D2 ou D3. Essa interação age de forma a bloquear a entrada da célula na fase G1 do ciclo celular, pois é o complexo CDC4/6 e Ciclina D1 que fosforila a proteína Retinoblastoma (pRb) e, portanto, libera as células do efeito supressor de seu crescimento proporcionado pela ação fisiológica da pRb quando em seu estado fosforilado (100, 101, 102).

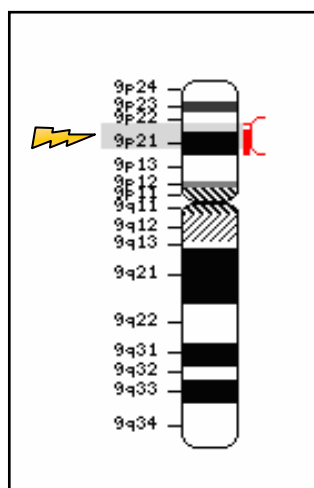


Figura 7. Representação esquemática da localização do gene P16^{CDKN2A} no cromossomo 9 humano. O gene P16^{CDKN2A} localiza-se no braço curto do cromossomo 9 humano na posição 9p21.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps>

A inativação do gene P16^{CDKN2A} resulta numa perda da regulação normal do ciclo celular e do crescimento observado em vários tumores humanos (101, 103). Anormalidades na via p16/ciclinas-D/pRb são comuns nas neoplasias humanas, sendo que a inativação do gene P16^{CDKN2A} é um evento frequentemente encontrado em muitos tipos de tumores, enfatizando o carcinoma de células escamosas da região de cabeça e pescoço (103, 104, 105).

A imunolocalização da p16^{CDKN2A} e características clínico-patológicas das lesões de carcinoma epidermóide mostraram uma forte correlação entre uma diminuição da imunolocalização da proteína p16 e o estadiamento dos tumores. Entretanto, o impacto dessa inativação funcional verificado nas lesões sobre o curso clínico dos pacientes permanece ainda indeterminado (101, 106). Alguns estudos mostraram a correlação entre a perda da expressão da p16 a um decréscimo das taxas de sobrevida, aumento do tamanho tumoral e risco da ocorrência de metástases (107).

A inativação do gene P16^{CDKN2A} foi observada em tumores, podendo ocorrer devido a alterações genéticas, como mutações e deleções, e também através do mecanismo da metilação da região promotora, resultando em um silenciamento gênico mediado epigeneticamente (43, 71). Sugere-se que a inativação do gene P16^{CDKN2A} ocorre em 68% dos tumores primários humanos, causada por deleções homozigótica em 27% dos casos, por mutações em 11%, e a hipermetilação promotora responde por 30% dos casos de inativação do gene, frequências estas, também, aplicáveis ao carcinoma de cabeça e pescoço (108, 109). No entanto, essa distribuição de eventos moleculares pode apresentar um perfil diferenciado; em cânceres de pulmão, a inativação do gene P16^{CDKN2A} é causada por hipermetilação promotora em mais de 70,0% dos casos (108).

A metilação do gene P16^{CDKN2A} foi associada ao desenvolvimento do câncer (110, 111, 112), enfatizando o câncer de cabeça e pescoço (98, 113, 114). Estudos têm sugerido o vírus HPV, pela ação da oncoproteína E7 derivada do vírus pode levar à metilação do gene P16^{CDKN2A} (35, 44) pelo aumento da atividade enzimática do DNMT3B (12, 43). O tabagismo foi outro fator apontado como precipitador da metilação do gene P16^{CDKN2A}, especialmente em adultos jovens (90, 98), podendo ser um evento importante em estádios iniciais de tumores sólidos (98,114).

1.3 Polimorfismos genéticos

O conceito tradicional de polimorfismo relaciona-se a alterações na carga genética dos indivíduos, ocorrendo em uma frequência de, no mínimo 1% de uma determinada população, que resultam em variações em um padrão ainda considerado biologicamente normal, podendo causar ou não alterações na função da proteína e fenótipo. Existe uma proposta para se agrupar polimorfismos genéticos e mutações em um único grupo, porém, na literatura, encontra-se uma grande variedade de nomenclatura destas variações nas sequências genéticas (116).

Um polimorfismo na região promotora poderá alterar a proporção da transcrição de uma determinada proteína. Já, quando localizado na região codificadora ou nos limites intron/exon, pode produzir proteínas incompletas ou inativas, como resultado de um *splicing* incorreto do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm). Polimorfismos genéticos caracterizados por completas deleções gênicas eliminam qualquer atividade funcional da proteína, enquanto polimorfismos genéticos que se associam duplicações do gene inteiro podem resultar em elevados níveis de atividade (117).

As técnicas mais usadas para se detectar a ocorrência de polimorfismos genéticos envolvem os polimorfismos genéticos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLPs) (118) e os polimorfismos genéticos de número variável de repetições em tandem (VNTRs) (119). Os RFLPs correspondem a polimorfismos genéticos de ponto que criam ou destroem sítios de restrição enzima-específicos. Para detecção desse polimorfismo utiliza-se de enzimas de restrição. Estas têm sequências de reconhecimento específicas no DNA. As alterações da sequência do DNA genômico acarretam na criação ou destruição de sítios de clivagem alterando, desse modo, o tamanho de um ou mais fragmentos de DNA oriundos da ação da enzima de restrição (117).

Os polimorfismos genéticos por inserção/deleção consistem numa série de comprimentos de fragmentos alélicos, relacionados entre si por um número variável de sequências de DNA repetidas em tandem no intervalo entre dois sítios de restrição são os VNTRs (119).

Os VNTRs e os RFLPs detectam polimorfismos de forma similar, através da amplificação da região de interesse pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) e, se necessário, posterior tratamento com enzimas de restrição que reconhecem sítios específicos e originam fragmentos de DNA com comprimentos variados. Enquanto os RFLPs revelam polimorfismos genéticos devido à presença ou ausência de um sítio de restrição, os VNTRs revelam polimorfismos genéticos devido a números diferentes de repetições situadas entre o sítio de amplificação (118, 119).

Polimorfismos genéticos funcionais em genes de citocinas e outros mediadores inflamatórios, que podem confirmar diferenças interindividuais na síntese e secreção dessas proteínas, têm sido associados a doenças que apresentam componentes inflamatórios (120) ou comportamentais (121). Portanto, a investigação e a caracterização dos elementos específicos alterados podem proporcionar biomarcadores aplicáveis em diagnóstico e prognóstico, estimando o risco em indivíduos (122).

1.3.1 Polimorfismo genético DNMT3B (C46359T)

O gene DNMT3B está localizado no cromossomo humano 20q11.2. É composto por 23 éxons e 22 íntrons, abrangendo cerca de 47 kb do DNA genômico (Figura 8). Esse gene exerce um importante papel no mecanismo da metilação *de novo* e, também, pode estar envolvido na carcinogênese (83). Um aumento na expressão do gene pode levar à geração de metilações aberrantes, favorecendo o desenvolvimento de diversos tipos de câncer (123, 124, 125, 126).

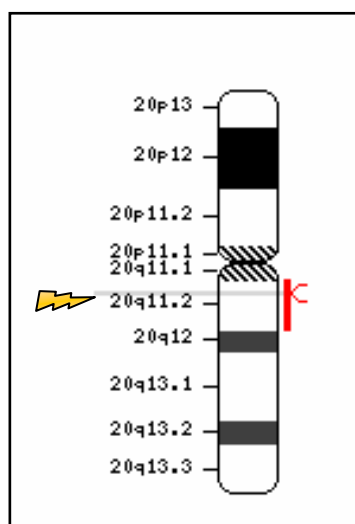


Figura 8. Representação esquemática da localização do gene DNMT3B no cromossomo 20 humano. O gene DNMT3B localiza-se no braço longo do cromossomo 20 humano na posição 20q11.2.

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps>

O gene DNMT3B é notadamente polimórfico apresentando, aproximadamente, 13 polimorfismos descritos (<http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>), dos quais foi identificada uma frequência considerável de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNP). Esse tipo específico de polimorfismo representa as formas mais comuns de variações genéticas humanas. Quando ocorrem na região promotora do

gene, podem afetar a expressão ou a atividade de enzimas e, portanto, estar associado ao risco de câncer (12, 59, 127, 128).

O gene DNMT3B possui um SNP de transição C para T (C46359T) na região promotora -149bp em relação ao sítio inicial de transcrição, conferindo um aumento de 30% na atividade promotora (12, 127). Foi postulado que a variante T regula o gene DNMT3B, podendo levar a um aumento de sua expressão e, com isso, resultar em uma predisposição para metilações de novo aberrantes em ilhas CpG de genes supressores de tumor e genes de reparo (128).

O genótipo transportador do alelo T foi associado a um risco aumentado para diversos tipos de câncer e a menores taxas de sobrevida (12, 57, 127, 129, 130, 131). No entanto, há uma escassez de pesquisas que avaliam as variações polimórficas DNMT3B (C46359T) em relação às características clínico-patológicas do carcinoma epidermóide na região de cabeça e pescoço, enfatizando o risco para a doença (57, 58, 59). Identificou-se uma associação entre esse polimorfismo e um risco aumentado para a doença, especialmente em adultos jovens, do gênero masculino, tabagistas e etilistas (59).

Associadas aos fatores ambientais, variações genéticas modulam o risco para o desenvolvimento do câncer, podendo, assim, servir como um bio-marcador para identificação da susceptibilidade para a doença (133). Alterações genéticas acumuladas mostraram-se associadas à progressão do câncer de cabeça e pescoço, resultante da inativação de múltiplos genes supressores tumorais e ativação de proto-oncogenes (134). O gene P16^{CDKN2A}, além de ser alvo de alterações genéticas relacionadas à doença, é um dos principais genes supressores tumorais epigeneticamente inativados (135, 136, 137). Nesse mecanismo, uma expressão aumentada do gene DNMT3B foi associada à inativação do gene

P16^{CDKN2A} (138, 139), sugerindo um papel oncogênico do DNMT3B durante tumorigênese. No entanto, a relação entre as variantes polimórficas DNMT3B (C46359T) e a metilação do gene P16^{CDKN2A} no carcinoma epidemóide de cabeça e pescoço não é descrita na literatura.

Conforme descrito anteriormente, se o polimorfismo DNMT3B (C46359T) for validado através de um número maior de estudos, este poderá ser utilizado para identificar padrões deletérios de silenciamento gênico através da metilação, especialmente no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (57).

1.4 O gene supressor de tumor *TP53*

O gene *TP53* está localizado no cromossomo humano 17p13. Compreende 11 éxons e 10 íntons, abrangendo cerca de 20 kb do DNA genômico (Figura 9). (140).

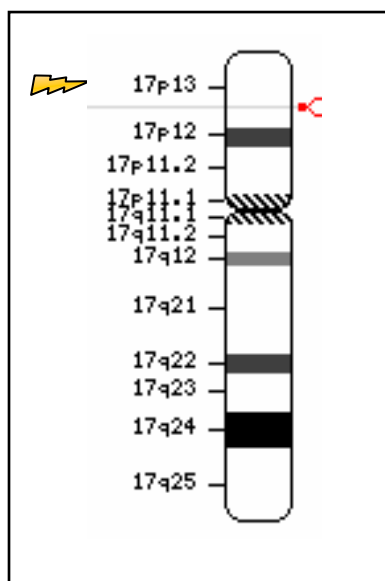


Figura 9. Representação esquemática da localização do gene *TP53* no cromossomo 17 humano. O gene *TP53* localiza-se no braço curto do cromossomo 17 humano na posição 17p13

Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/maps>

O *TP53* é um gene supressor de tumor que se encontra mutado na grande maioria dos cânceres humanos. Na sua forma selvagem atua monitorando a integridade do genoma, exercendo uma ação fundamental de bloqueio do ciclo celular diante de uma injúria ao DNA, ou ativando a morte celular programada (apoptose) se tais injúrias não forem reparadas no código genético (141, 142). Nesse mecanismo, o gene *TP53*, através de seu produto gênico, age no sentido de induzir a célula a entrar em apoptose, por estimular o gene *BAX* e reprimir a transcrição *BCL-2*. Quando o gene deixa de exercer sua função devido a alterações

genéticas, estas podem ser transmitidas às células filhas, podendo se acumular no genoma e, em determinado momento, estas alterações tornar-se-ão suficientes para desencadear transformações celulares (143).

O produto protéico do gene *TP53*, a fosfoproteína nuclear p53, age nos mecanismos de controle do crescimento normal e da homeostase de células e tecidos, evitando a proliferação de células que apresentem seu DNA danificado (144). O produto gênico selvagem possui um curto período de meia-vida, na ordem de 20 a 30 minutos, por isso não é detectada por meio de análises imunohistoquímicas. A proteína mutada é mais estável e está associada com o acúmulo dessa proteína no núcleo celular podendo, assim, ser detectada através de imunohistoquímica (145).

Diversos estudos têm apontado o gene *TP53* como alvo mais comum de mutações relacionadas ao desenvolvimento da carcinogênese. No entanto, as pesquisas são conflitantes em mostrar a relação de mutações nesse gene com o comportamento biológico de tumores, a taxa de sobrevida e em prever a resposta das células tumorais ao tratamento para o câncer de cabeça e pescoço (146, 147, 148, 149, 150).

Mutações no gene *TP53* têm mostrado uma associação com risco aumentado de recorrência loco-regional após tratamento radioterápico em câncer de cabeça e pescoço, incluindo o carcinoma epidermóide bucal, embora nenhuma relação tenha sido encontrada entre mutação do p53 e taxa de sobrevida (146).

A diversidade de alterações gênicas no gene *TPp53*, seja por mutação, deleção, ação viral sobre o DNA ou inativação por outro gene, destacando o MDM2, contribui enormemente para uma resposta desfavorável em tumores de cabeça e pescoço refratários à radioterapia e quimioterapia (151).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estudar a influência da idade sobre parâmetros clínicos, genéticos e epigenéticos no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, com um enfoque na metilação do gene P16^{CDKN2A}, polimorfismo DNMT3B (C46359T) e imunolocalização da proteína p53.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Verificar a associação entre parâmetros clínico-patológicos e moleculares do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e a idade, considerando indivíduos jovens em relação aos indivíduos de idade superior a 45 anos, acometidos pela doença.

2.2.2 Investigar a associação do polimorfismo DNMT3B(C46359T) com parâmetros clínico-patológicos, tais como gênero, história familiar para o câncer, idade, sítio anatômico, estadiamento clínico, tamanho da lesão, metástases regionais, taxas de sobrevida e graduações histológicas.

2.2.3 Investigar a associação da metilação do gene P16^{CDKN2A} com parâmetros clínico-patológicos, tais como gênero, história familiar para o câncer, idade, sítio anatômico, estadiamento clínico, tamanho da lesão, metástases regionais, taxas de sobrevida e graduações histológicas.

- 2.2.4 Verificar a associação entre variações genótípicas devido ao polimorfismo DNMT3B (C46359T) com o *status* da metilação do gene P16^{CDKN2A} em indivíduos jovens em relação aos indivíduos classicamente acometidos pela doença.
- 2.2.5 Investigar a associação de parâmetros clínico-patológicos e moleculares no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço com a imunolocalização da proteína DNMT3b, responsável pela metilação.
- 2.2.6 Analisar diferenças em relação à idade, sobrevida e imunolocalização da da proteína p53 e parâmetros clínico-patológicos diversos no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

3 METODOLOGIA

Este trabalho foi descrito sob a forma de artigo científico, cuja metodologia e discussão encontram-se descritas, em sua totalidade, no texto do artigo submetido à publicação em periódico indexado.

- Título: “Differences between young and older head and neck squamous cell carcinoma patients: Focus on the effect of P16^{CDKN2A} methylation and DNMT3B (C46359T) polymorphism in survival”

Um estudo epidemiológico relacionado ao carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço foi realizado concomitantemente à pesquisa de dissertação de mestrado.

- Título: “Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization”

Os artigos foram estruturados com base nas normas de publicação do periódico. Após sua apresentação, seguir-se-ão as considerações finais, bem como as referências relacionadas à dissertação em geral.

4 PRODUTOS ALCANÇADOS

4.1 Artigo científico I

Differences between young and older head and neck squamous cell carcinoma patients: Focus on the effect of P16^{CDKN2A} methylation and DNMT3B (C46359T) polymorphism in survival

Lucyana Conceição Farias¹, Carlos Alberto de Carvalho Fraga¹, Marcos Vinícius Macedo de Oliveira¹, Thiago Fonseca Silva¹, Alfredo Maurício Batista De-Paula¹, Paula Rocha Moreira², Ricardo Santiago Gomez², André Luiz Sena Guimarães^{1*}

¹Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Brazil.

²Department of Clinical, Surgery and Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

***Correspondence to:**

André Luiz Sena Guimarães
Universidade Estadual de Montes Claros
Hospital Universitário Clemente de Faria
Laboratório de Pesquisa em Saúde
Avenida Cula Mangabeira, 562
Montes Claros
Minas Gerais, Brasil
cep 39401-001,
e-mail: andreluizguimaraes@gmail.com

DNA methylation is a relevant epigenetic mechanism, which represses gene transcription and commonly inactivates tumor suppressor genes in carcinogenesis. A single nucleotide polymorphism of DNMT3B, C46359T (-149C>T) was reported to modulate individual's susceptibility to cancers. The purpose of the current study was to investigate if there is a link between DNMT3B (C46359T) polymorphism, DNMT3B immunoeexpression, *P16^{CDKN2A}* methylation, clinical parameters and survival in HNSCC young patients. In the current study, the presence of the allele T of the polymorphism DNMT3B (-149C>T) was associated with advanced TNM staging and smoking habit, but no association was found between polymorphic variables and DNMT3B immunostaining. While *P16^{CDKN2A}* methylation was significantly associated with smoking habit in older patients, this parameter was associated with the presence of family history of cancer in young patients. Moreover, in older patients the absence of *P16^{CDKN2A}* promoter methylation had a negative impact in the survival. In conclusion, our data suggests that while genetic factors are more importantly involved with *P16^{CDKN2A}* methylation in younger individuals with HNSCC, environmental factors are more important for this epigenetic change in older patients. Finally, the present study shows that *P16^{CDKN2A}* methylation status has impact on the prognosis of patients with HNSCC.

Key words: DNMT3B; polymorphism; *p16^{CDKN2A}*; methylation; head and neck cancer.

Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common type of cancer and represent 350 000 cancer deaths worldwide every year (1;2). It includes malign epithelial neoplasms that arise in the paranasal sinuses, nasal cavity, oral cavity, pharynx, and larynx (3). In Brazil, considering only oral cavity, the estimative for 2009 is 14.160 new cases of squamous cell carcinoma according to the National Institute of Cancer (INCA) (4). HNSCC has been regarded as a disease that generally affects men between the sixth through the eighth decades of life following long term exposure to smoking and alcohol intake (5). However, an increase in the incidence of head and neck cancer among younger patients under the age of 45 years has been reported worldwide (6-12). Evidences suggests that carcinogenesis in young adults have a distinct mechanism of disease and often is not associated with classic risk factors for HNSCC (7;12). Differences in prognosis were observed in HNSCC patients according to the age (13). Classically, the development of cancer in human has been viewed as a disease related to progressive genetic alterations (14-16). Recently, evidences indicate that not only genetic factors but also epigenetic modifications are similarly relevant in carcinogenesis (17;18). In contrast to genetic alterations, epigenetic modifications are reversible (19;20). This feature makes them attractive targets for therapeutic intervention (21;22).

The DNA methylation is the addition of methyl radical to specific regions of DNA containing, predominantly, cytosine nucleotides. It is catalyzed by a family of enzymes denominated DNA methyltransferase (DNMTs), including three catalytically active enzymes - DNMT1, DNMT3a and DNMT3b. Although these enzymes act cooperatively to establish a pattern of genomic methylation, specific functions are performed by DNMTs. DNMT1 is an enzyme of maintenance, while DNMT3a and DNMT3b are responsible for the establishment of a new methylation pattern, known as *de novo* methylation (23;24). In addition to important role in controlling gene activity, embryonic development, genomic imprinting (25), methylation have been associated with the development of cancer by transcriptional inactivation of tumor suppressor genes (18;25). The pattern of methylation has been linked to several cancers, such as lung (18) and head and neck squamous cell carcinomas (26;27).

Genetic polymorphisms described in the DNMT3b gene might be associated with a variety of cancers (28-33), including head and neck squamous cell carcinoma (34-36). It was postulated that a variant T in the -149 position might increase

DNMT3B expression, resulting in a predisposition to aberrant *de novo* methylation of tumor suppressor genes and repair genes (37-39).

The $P16^{CDKN2A}$ is a tumor suppressor gene that encodes a cyclin dependent kinase inhibitor which plays an important role in the regulation of the G1/S phase cell cycle checkpoint. Inactivation of p16 protein can be present in many tumors caused by genetic punctual mutation, homozygous deletion or methylation of the promoter region (40-46). Evidences suggest that an increase expression of DNMT3B may lead to a p16 inactivation in carcinogenesis (47;48). But, the role of methylation pathway in the survival of HNSCC patients has not been established. Thus, we hypothesized that the polymorphism of DNMT3B (C46359T) could promote high levels of DNMT3B expression, $P16^{CDKN2A}$ methylation and consequently HNSCC early development. Furthermore, we attempted to verify whether this possible association is dependent of age and impacted the survival.

Patients and methods

Patients

The present analysis was based on a case-control study design. The patients were recruited from databases of the head and neck surgery services in Montes Claros, Brazil from 1996 through 2007 (12). The study group included 75 patients with HNSCC consisting of a case group of 25 patients with aged ≤ 45 years (young) and a control group of 50 patients with aged > 45 years (older patients), that were matched for TMN staging, smoking and alcohol intake. Young and older patients were from the same geographical area.

Clinical data

The mean age was 42.1 years (SD 3.17 years; range, 33-45 years) for younger and 62.2 years (SD 8.0 years; range, 49-82 years) for HNSCC older patients. Physical description of skin color was not used because, in Brazil, it is a poor predictor of genomic ancestry (49;50). The study was approved by the local Ethics Committee (process number 1085). Information on age, sex, tobacco smoking, alcohol drinking, medical history, family cancer history, tumor site, TNM clinical staging, and survival were obtained from medical charts.

All patients were staged according to the UICC TNM Classification of Malignant Tumors (1997) (51). Lesions of HNSCC were classified according to the primary site as described in the International Classification of Diseases (ICD-10) for Oncology. The anatomical sites reviewed in this study included: (1) 28 (37.3%) mouth and perioral region (C00, C01, C02, C04, C05, C06.0, C06.2); (2) 22 (29.3%) oropharynx (C09–C10) of the patients; and (3) hypopharynx–Larynx 25 (23.4%) (C12, C13, C32). Lesions located in the oral cavity were considered as the anterior group and those located in the oropharynx–hypopharynx–larynx as the posterior group. Patients with diagnosis of carcinoma *in situ* or multiple head and neck carcinomas were excluded. All patients were asked about the occurrence of cancer in a first degree relative. The term cancer was defined using the WHO definition of “an uncontrolled growth and spread of cells that may affect almost any tissue of the body”.

Histological Gradation

Histological sections of tissues were stained with hematoxylin-eosin and evaluated under conventional light microscopy. All patients had histologically confirmed squamous cell carcinoma of head and neck. Histopathological classification of the tumors as well, moderate, or poorly differentiated was based on the World Health Organization criteria (WHO, 1997) and invasive front area was also evaluated as described elsewhere (52).

DNA isolation and Bisulfite Conversion of DNA for Methylation-specific PCR (MSP)

DNA was isolated from ten 10- μ m-thick tissue sections from each tissue block of HNSCC specimens, using the DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) according to the manufacturer's protocol. The $P16^{CDKN2A}$ gene methylation profile was evaluated through Methylation-specific PCR (MSP). DNA samples were bisulfite-treated for 3 hours and MSP-PCR was performed as described (53) and posteriorly modified (54). Primers sequences, PCR product and polymerase chain reaction thermal conditions for defining methylation status are presented in table 1. The $P16^{CDKN2A}$ promoter methylation status for methylated or unmethylated reactions was identified by a fragment of 150 and 151 bp respectively (Figure1).

DNMT3B Genotyping

DNMT3B (C46359T) polymorphism was assessed by RFLP (table 1). Polymerase chain reaction for DNMT3B was performed out in a total volume of 25 μ L containing approximately 100ng genomic DNA as template, 0.5 μ L of each primer (20 pmol/ μ L), 2.5 μ L dNTP-mix (25 mM of each, AMRESCO, Ohio, CA), 2.5 μ L 10X PCR buffer, 1.25 μ L magnesium chloride (50 mM), 2.5 units of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

The 230-bp PCR product from the DNMT3B gene was digested with Bln1 restriction endonuclease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), that recognize a restriction site (C/CTAGG) in T allele; wild-type C allele lacks the Bln1 restriction site. Thus, the wild-type C allele has only one band (230-bp), while the polymorphic T allele has two bands (172 and 58-bp). For that, 10 μ L amplified DNA was digested with 2.5 U of

Bln1 for 16 h at 37°C. PCR and restriction reactions were performed into a thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, GE) (Figure 1). DNA sequencing was realized to confirm the DNMT3B genotyping by PCR-RFLP.

Electrophoresis

The PCR products for methylation and digested fragments were verified on 6.5% polyacrylamide gel electrophoresis at 120V of constant voltage for 1.5 hours and stained with silver nitrate. Electrophoresis results were estimated in regarding to a 100-bp ladder.

Immunohistochemical analyses

Paraffin sections (3- μ m) were mounted on glass, and dried overnight at 37°C. All sections were then deparaffinized in xylene, rehydrated through a series of alcohol, and washed in phosphate-buffered saline. Anti-DNMT3b monoclonal antibody (diluted 1:250, IMGENEX, CA, USA) was used as the primary antibody and the incubation time was 18h at 4°C. Endogenous peroxidase was blocked by incubation with 0.03% H₂O₂ in ethanol for 30 minutes. For antigen retrieval, sections for were heated in a steam cooker filled for 5 min at 125°C in Tris-EDTA buffer (1mM Tris base, 1 mM EDTA solution, 0.05% Twen 20, pH 9.0). Signals were developed with 3'3-diaminobenzidine-tetrahydrochloridre for 5 min and counter-stained with Harris hematoxylin for 30 sec. Normal mucosa were used as positive control and for negative control the primary antibody was replaced with phosphate buffered saline. After staining, tissue sections were scored according to the percentage of positive cells among the neplastic cells.

Statistical analysis

Statistical significance of differences between case and control group distributions for alleles, genotypes, methylation status, immunohistochemical analysis and clinicopathological features was determined using Fisher or chi-square tests. The possible association between genotypes and DNMT3B immunostaining was evaluated by Kruskal-Wallis Test.

Time survival was calculated from data of diagnose to time of last follow-up visit or to time of death. The records of each patient were reviewed, considering the same parameters, for 0–2500 days. All deaths were caused by locoregional and/or metastatic disease. For purposes of analysis, patients who died without evidence of recurrence were excluded. Time survival was displayed by means of the Kaplan-Meier method for the variables. The results of Kaplan-Meier were compared by the log-rank test. Variables with $p \leq 0.25$ alongside age, $P16^{CDKN2A}$ methylation status, DNMT3B genotypes and immunostaining were included in the Cox proportional hazards multivariate model. Categorical variables considered as referents were those associated with less risk of death in accordance with the literature. All analyses were assessed using SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago) and statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Association of P16^{CDKN2A} promoter methylation, DNMT3b polymorphism and clinicopathological parameters of HNSCC patients

The frequency distributions of P16^{CDKN2A} promoter methylation according to age, molecular features and clinicopathological parameters are summarized in table II. No difference between P16^{CDKN2A} methylation and age was observed. In young patients we identified a significant association between P16^{CDKN2A} methylation with the presence of family history of cancer and male gender. On the other hand, in the older patients, P16^{CDKN2A} methylation was significantly increased in the presence of smoking habit. Considering all patients, P16^{CDKN2A} methylation was increased not only in men but also in smokers (table II). Differences in gender habits were observed according to the age. In young patients, no differences of tobacco addiction and gender were observed (p= 0.072). However, considering all patients together or only older patients, men were more associated with the presence of tobacco habit when compared with women (p=0.001) (data not shown). No relation of DNMT3B immunostaining and P16^{CDKN2A} methylation was observed.

Table III presents the distribution of molecular and clinicopathological parameters grouped by age and DNMT3B variants. No association between clinicopathological parameters and the polymorphic variables were observed in young patients. The T allele of DNMT3B genotype was significantly associated with advanced TNM staging and tumor size in the older patients. Considering all sample, the distribution of allele T was increased in the T3/T4 tumors. No relation between polymorphic variants of DNMT3B gene and P16^{CDKN2A} promoter methylation was identified in this sample. Moreover, neither polymorphic variables nor clinicopathological parameters presented association with immunoeexpression of DNMT3B.

Molecular findings and survival of HNSCC patients

The mean survival of overall patients was 1021.5 days after the diagnosis. Factors which impacted in survival were differently distributed among the groups. In young patients no factor was associated with death. Considering both groups

together, only TNM staging impacted in survival. However, in older patients, not only TNM staging but also the absence of *P16^{CDKN2A}* promoter methylation showed a negative impact in the survival (Table IV).

Discussion

The factors which influence DNMTs expression in human tissues have not been clearly determined (55). Recently, the role of ageing in DNA methylation was reported in liver cells (56). On the other hand, methylation of tumor suppressor genes, such as $P16^{CDKN2A}$, has been associated to HNSCC development (48;57;58). So, the purpose of the current study was to investigate if there is a link between DNMT3B C46359T polymorphism, DNMT3B immunoexpression, $P16^{CDKN2A}$ methylation, clinical parameters and survival in HNSCC young patients. We observed that the frequency of $P16^{CDKN2A}$ methylation in young patients was not different from older patients with HNSCC and in both groups most of the tumors presented this epigenetic alteration (76%). Taken together, this data indicate that this alteration is a common event in HNSCC development.

Although, $P16^{CDKN2A}$ methylation in young patients was associated with family history of cancer, it is important to consider the higher presence of family history of cancer in young patients in the present study and larger scale study of the same population (12). This could be a confounding factor.

In the present study we found association between $P16^{CDKN2A}$ methylation in young patients and male gender. Because of the limited number of patients of female gender, this data must be analyzed cautiously.

We observed that $P16^{CDKN2A}$ methylation in older patients was significantly associated with smoking habit. Smoking is an important factor associated with methylation of genes related to cancer (58;59). 7-methylguanine (m7Gua) is a biomarker of methylating agents presented in tobacco (60). Recent articles observed that age and cigarette smoking were positively correlated with the urinary m7Gua level (61). The urinary excretion of m7Gua was shown to be higher in smokers than in non-smokers (62). Furthermore, the m7Gua level in human urine decreased after smoking cessation (63). It is important to highlight that, in the current study, no $P16^{CDKN2A}$ methylation was observed in non smokers. Considering these facts together not only smoking but also aging could be important factors to DNA methylation.

In recent years, several studies have demonstrated that genetic polymorphisms are associated with susceptibility to, or protection from, cancer development (35;64;65). Until now, 13 polymorphisms were described in DNMT3B gene in NCBI. Recently, it was demonstrated an increased risk of HNSCC

development with the T allele of DNMT3B -149 polymorphism in oral cavity, pharynx and larynx (35) but not in nasopharynx (34). In the present study we attempted to verify the possible association between this polymorphism and early HNSCC development. We did not observe association between DNMT3B polymorphic variant and age. But, in the older patients group we found association between the higher DNMT3B genotype (allele T) with an advance TNM staging, but no association was found with survival. Although this finding suggests that polymorphisms might influence cancer progression, there is long way to prove this association.

The polymorphisms may alter gene transcription and/or protein synthesis and function. The immunoexpression of DNMT3B protein was not related to the genetic polymorphisms in HNSCC samples studied. Moreover, this polymorphism did not show association with $P16^{CDKN2A}$ methylation. This may be explained by the fact that others factors, such as HPV high-risk infection, may induce $P16^{CDKN2A}$ methylation (46;66). Furthermore, other DNMTs polymorphisms may be more relevant to this epigenetic alteration.

Evidences suggest that there are differences in molecular mechanisms between younger and older HNSCC patients (7;12). Absence of $P16^{CDKN2A}$ methylation was associated with low survival in older patients. Therefore, it can be speculated that different epigenetic and genetic pathways may affect cancer evolution and prognosis. Although we are just at the begging to understand this new research field, HPV infection, for example, seems to impact on the prognosis of HNSCC (67;68).

In conclusion, our data suggests that while genetic factors are more importantly involved with $P16^{CDKN2A}$ methylation in younger individuals with HNSCC, environmental factors are more important for this epigenetic change in older patients. Finally, the present study shows that $P16^{CDKN2A}$ methylation status has impact on the prognosis of patients with HNSCC.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Dr Guimarães, Dr. Moreira and Dr Gomez are research fellow of CNPq. Dr De Paula is a research fellow of FAPEMIG.

Reference List

- (1) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005 Mar;55(2):74-108.
- (2) Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001 Sep;2(9):533-43.
- (3) Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008 May 17;371(9625):1695-709.
- (4) National Cancer Institute (INCA). Estimate 2008: Brazilian cancer incidence. <http://www.inca.gov.br/regpop> 2005; Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância./2007.
- (5) Argiris A, Eng C. Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. *Cancer Treat Res* 2003;114:15-60.
- (6) Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000 Jan;122(1):44-51.
- (7) Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya S. Factors associated with delay in presentation among younger patients with oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004 Jun;97(6):707-13.
- (8) Manuel S, Raghavan SK, Pandey M, Sebastian P. Survival in patients under 45 years with squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003 Apr;32(2):167-73.
- (9) Garavello W, Spreafico R, Gaini RM. Oral tongue cancer in young patients: A matched analysis. *Oral Oncol* 2007 Feb 15.
- (10) Gawecki W, Kostrzevska-Poczekaj M, Gajecka M, Milecki P, Szyfter K, Szyfter W. The role of genetic factor in etiopathogenesis of squamous cell carcinoma of the head and neck in young adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007 Dec;264(12):1459-65.
- (11) Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, Udagama MN, Ogawa I, Kudo Y, Takata T, Tilakaratne WM. Analysis of histopathological and immunohistochemical differences of oral squamous cell carcinoma in young and old patients in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med* 2007 Jul;36(6):357-62.
- (12) De Paula AM, Souza LR, Farias LC, Correa GT, Fraga CA, Eleuterio NB, Silveira AC, Santos FB, Haikal DS, Guimaraes AL, Gomez RS. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral Oncol* 2009 Apr 7.
- (13) Chitapanarux I, Lorvidhaya V, Sittitrai P, Pattarasakulchai T, Tharavichitkul E, Sriuthaisiriwong P, Kamnerdsupaphon P, Sukthomya V. Oral cavity cancers at

- a young age: analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital. *Oral Oncol* 2006 Jan;42(1):83-8.
- (14) Kannan K, Latha PN, Shanmugam G. Expression of bcl-2 oncoprotein in Indian oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1998 Sep;34(5):373-6.
 - (15) Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000 May;36(3):256-63.
 - (16) Toruner GA, Ulger C, Alkan M, Galante AT, Rinaggio J, Wilk R, Tian B, Soteropoulos P, Hameed MR, Schwalb MN, Dermody JJ. Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2004 Oct 1;154(1):27-35.
 - (17) Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002 Jun;3(6):415-28.
 - (18) Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003 Nov 20;349(21):2042-54.
 - (19) Momparler RL. Cancer epigenetics. *Oncogene* 2003 Sep 29;22(42):6479-83.
 - (20) Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol* 2004 Dec;14(6):427-32.
 - (21) Teodoridis JM, Strathdee G, Brown R. Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. *Drug Resist Updat* 2004 Aug;7(4-5):267-78.
 - (22) Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer* 2006;5:60.
 - (23) Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 2004 Oct;61(19-20):2571-87.
 - (24) Gronbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 2007 Oct;115(10):1039-59.
 - (25) Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002 Aug 12;21(35):5427-40.
 - (26) Shaw RJ, Hall GL, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Field JK, Liloglou T, Risk JM. Quantitative methylation analysis of resection margins and lymph nodes in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2007 Dec;45(8):617-22.
 - (27) Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, Souza FP, Filho JF, Fukuyama EE, Camargo AA, Caballero OL, Tajara EH, Cordeiro JA, Rahal P. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2007 Feb;173(1):31-7.

- (28) Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 1999 Jun 1;27(11):2291-8.
- (29) Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2001 Mar 1;97(5):1172-9.
- (30) Patra SK, Patra A, Zhao H, Dahiya R. DNA methyltransferase and demethylase in human prostate cancer. *Mol Carcinog* 2002 Mar;33(3):163-71.
- (31) Nagai M, Nakamura A, Makino R, Mitamura K. Expression of DNA (5-cytosin)-methyltransferases (DNMTs) in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 2003 Jul;26(3):186-91.
- (32) Montgomery KG, Liu MC, Eccles DM, Campbell IG. The DNMT3B C-->T promoter polymorphism and risk of breast cancer in a British population: a case-control study. *Breast Cancer Res* 2004;6(4):R390-R394.
- (33) Jones JS, Amos CI, Pande M, Gu X, Chen J, Campos IM, Wei Q, Rodriguez-Bigas M, Lynch PM, Frazier ML. DNMT3b polymorphism and hereditary nonpolyposis colorectal cancer age of onset. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 May;15(5):886-91.
- (34) Chang KP, Hao SP, Liu CT, Cheng MH, Chang YL, Lee YS, Wang TH, Tsai CN. Promoter polymorphisms of DNMT3B and the risk of head and neck squamous cell carcinoma in Taiwan: a case-control study. *Oral Oncol* 2007 Apr;43(4):345-51.
- (35) Liu Z, Wang L, Wang LE, Sturgis EM, Wei Q. Polymorphisms of the DNMT3B gene and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Lett* 2008 Sep 8;268(1):158-65.
- (36) Wang L, Rodriguez M, Kim ES, Xu Y, Bekele N, El-Naggar AK, Hong WK, Mao L, Oh YW. A novel C/T polymorphism in the core promoter of human de novo cytosine DNA methyltransferase 3B6 is associated with prognosis in head and neck cancer. *Int J Oncol* 2004 Oct;25(4):993-9.
- (37) Shen H, Wang L, Spitz MR, Hong WK, Mao L, Wei Q. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res* 2002 Sep 1;62(17):4992-5.
- (38) Singal R, Das PM, Manoharan M, Reis IM, Schlesselman JJ. Polymorphisms in the DNA methyltransferase 3b gene and prostate cancer risk. *Oncol Rep* 2005 Aug;14(2):569-73.
- (39) Wu Y, Lin JS. DNA methyltransferase 3B promoter polymorphism and its susceptibility to primary hepatocellular carcinoma in the Chinese Han nationality population: a case-control study. *World J Gastroenterol* 2007 Dec 7;13(45):6082-6.

- (40) Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996 Aug 15;56(16):3630-3.
- (41) Hogg RP, Honorio S, Martinez A, Agathangelou A, Dallol A, Fullwood P, Weichselbaum R, Kuo MJ, Maher ER, Latif F. Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene from region 3p21.3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 2002 Aug;38(12):1585-92.
- (42) Yakushiji T, Uzawa K, Shibahara T, Noma H, Tanzawa H. Over-expression of DNA methyltransferases and CDKN2A gene methylation status in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oncol* 2003 Jun;22(6):1201-7.
- (43) Schneider BG, Gulley ML, Eagan P, Bravo JC, Mera R, Geradts J. Loss of p16/CDKN2A tumor suppressor protein in gastric adenocarcinoma is associated with Epstein-Barr virus and anatomic location in the body of the stomach. *Hum Pathol* 2000 Jan;31(1):45-50.
- (44) Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16(INK4A) gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2001 Feb 26;163(2):221-8.
- (45) Esteller M. The coming of age of DNA methylation in medicine in the genomics and postgenomics era. *Clin Immunol* 2002 Jun;103(3 Pt 1):213-6.
- (46) Lin TS, Lee H, Chen RA, Ho ML, Lin CY, Chen YH, Tsai YY, Chou MC, Cheng YW. An association of DNMT3b protein expression with P16INK4a promoter hypermethylation in non-smoking female lung cancer with human papillomavirus infection. *Cancer Lett* 2005 Aug 8;226(1):77-84.
- (47) Wang J, Walsh G, Liu DD, Lee JJ, Mao L. Expression of Delta DNMT3B variants and its association with promoter methylation of p16 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2006 Sep 1;66(17):8361-6.
- (48) Simao TA, Simoes GL, Ribeiro FS, Cidade DA, Andreollo NA, Lopes LR, Macedo JM, Acatauassu R, Teixeira AM, Felzenszwalb I, Pinto LF, Albano RM. Lower expression of p14ARF and p16INK4a correlates with higher DNMT3B expression in human oesophageal squamous cell carcinomas. *Hum Exp Toxicol* 2006 Sep;25(9):515-22.
- (49) Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Jan 7;100(1):177-82.
- (50) Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 2006;62(4):190-5.
- (51) Sobin LH. TNM: evolution and relation to other prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2003;21(1):3-7.

- (52) Bryne M, Nielsen K, Koppang HS, Dabelsteen E. Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. *J Oral Pathol Med* 1991 Sep;20(8):369-72.
- (53) Goldenberg D, Harden S, Masayeva BG, Ha P, Benoit N, Westra WH, Koch WM, Sidransky D, Califano JA. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004 Jan;130(1):39-44.
- (54) Moreira PR, Guimaraes MM, Guimaraes AL, Diniz MG, Gomes CC, Brito JA, Gomez RS. Methylation of P16, P21, P27, RB1 and P53 genes in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2009 Jan;38(1):99-103.
- (55) Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev* 2003 Jul;2(3):245-61.
- (56) Xiao Y, Word B, Starlard-Davenport A, Haefele A, Lyn-Cook BD, Hammons G. Age and gender affect DNMT3a and DNMT3b expression in human liver. *Cell Biol Toxicol* 2008 Jun;24(3):265-72.
- (57) Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene* 2002 Jun 20;21(27):4231-6.
- (58) Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, Shibata T. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol* 2006 Nov;132(11):735-43.
- (59) Kim DS, Cha SI, Lee JH, Lee YM, Choi JE, Kim MJ, Lim JS, Lee EB, Kim CH, Park TI, Jung TH, Park JY. Aberrant DNA methylation profiles of non-small cell lung cancers in a Korean population. *Lung Cancer* 2007 Oct;58(1):1-6.
- (60) Hecht SS. DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutat Res* 1999 Mar 8;424(1-2):127-42.
- (61) Tamae K, Kawai K, Yamasaki S, Kawanami K, Ikeda M, Takahashi K, Miyamoto T, Kato N, Kasai H. Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci* 2009 Apr;100(4):715-21.
- (62) Stillwell WG, Glogowski J, Xu HX, Wishnok JS, Zavala D, Montes G, Correa P, Tannenbaum SR. Urinary excretion of nitrate, N-nitrosoproline, 3-methyladenine, and 7-methylguanine in a Colombian population at high risk for stomach cancer. *Cancer Res* 1991 Jan 1;51(1):190-4.
- (63) Ichiba M, Matsumoto A, Kondoh T, Horita M, Tomokuni K. Decreasing urinary PAH metabolites and 7-methylguanine after smoking cessation. *Int Arch Occup Environ Health* 2006 Aug;79(7):545-9.

- (64) Gomes CC, Drummond SN, Guimaraes AL, Andrade CI, Mesquita RA, Gomez RS. P21/ WAF1 and cyclin D1 variants and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2008 Mar;37(3):151-6.
- (65) Drummond SN, De ML, Noronha JC, Gomez RS. GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004 Jan;40(1):52-5.
- (66) Wu MF, Cheng YW, Lai JC, Hsu MC, Chen JT, Liu WS, Chiou MC, Chen CY, Lee H. Frequent p16INK4a promoter hypermethylation in human papillomavirus-infected female lung cancer in Taiwan. *Int J Cancer* 2005 Jan 20;113(3):440-5.
- (67) Kong CS, Narasimhan B, Cao H, Kwok S, Erickson JP, Koong A, Pourmand N, Le QT. The relationship between human papillomavirus status and other molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009 Jun 1;74(2):553-61.
- (68) Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S, Palermo R, Best S, Ulmer KM, Levine M, Zinreich E, Messing BP, Gold D, Wu AA, Niparko KJ, et al. Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Laryngoscope* 2009 Jun 11.

Figure 1

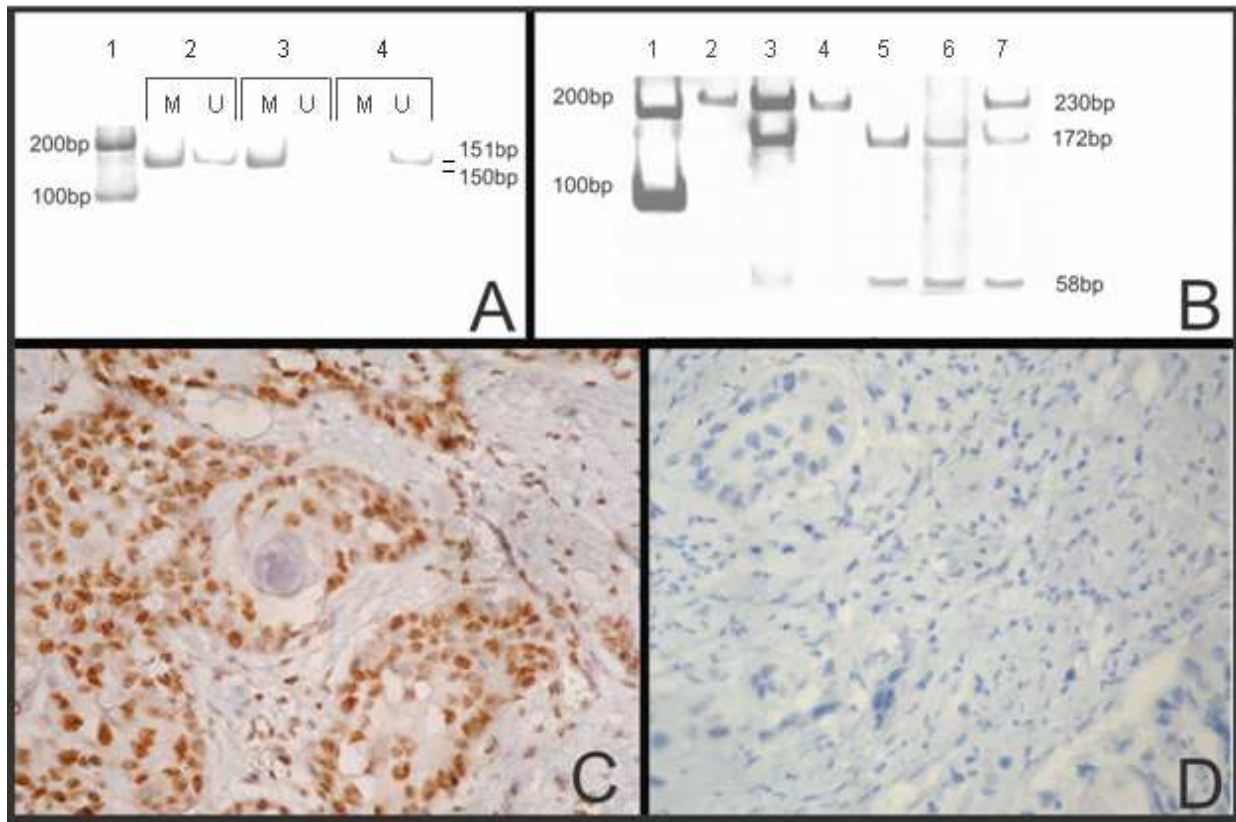


Figure 1A - Methylation-specific PCR of p16^{CDKN2} gene. 'M' and 'U' represent primer sets specific to methylated and unmethylated DNA, respectively. The P16^{CDKN2A} promoter methylation status for methylated or unmethylated reactions was identified by fragment of 150 and 151 bp, respectively. Samples 2 and 3 contain methylated DNA (M) indicative of the presence p16 methylation. Contrariwise, sample 4 shows the unmethylated status of p16 gene because of absence of methylated reaction (M). Lane 1: 100-bp molecular marker.

Figure 1B - PCR-RFLP for genotyping of DNMT3B (C46359T) polymorphism. Lane 1: 100-bp molecular marker, lanes 2 and 4: CC genotype, lane 3 and 7: CT genotype, lane 5 and 6: TT genotype.

Figure 1C - Positive immunostaining of DNMT3b in 400 x power magnification.

Figure 1D - Negative immunostaining of DNMT3b in 400 x power magnification.

Tables

Table I - Primer sequences, PCR product and polymerase chain reaction thermal conditions

	Primer sequences	PCR product (bp)	References*	PCR thermal conditions
<i>DNMT3B</i> (C46358T)	F 5'-TGGCTACCAGGTCTCCTTGGCC-3' R 5'-GGTAGCCGGAACTCCACGG-3'	230	Own design**	1 x 95°C-5' 35 x 95°C-1' 1 x 72°C-10' 68,4°C-1' 72°C-1'
Methylated P16CDKN2A	F 5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCC-3' R 5'-GACCCCGAACCGACCGTAA-3'	150	Moreira at al., 2009	1 x 95°C-5' 35 x 95°C-1' 1 x 72°C-10' 64°C-1' 72°C-1'
Unmethylated P16CDKN2A	F 5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3' R 5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'	150	Moreira at al., 2009	1 x 95°C-5' 35 x 95°C-1' 1 x 72°C-10' 64°C-1' 72°C-1'

* Reference utilized only to primer sequence

** It was designed based on the GenBank reference sequence (accession n°.NG_007290), using the software "Annhyb" (<http://annhyb.free.fr>) and Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Table II - P16^{CDKN2A} methylation and their association with molecular and clinicopathological features in case and control HNSCC

Variables	All patients (%)		Younger patients (%)		Older patients (%)	
	P16 methylation status		P16 methylation status		P16 methylation status	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Gender						
Male	53 (89.8)	11 (68.7)	16 (94.1)	05 (62.5)	37 (88.1)	06 (75.0)
Female	06 (10.2)	05 (31.3)	01 (5.9)	03 (37.5)	05 (11.9)	02 (25.0)
<i>p</i> -value	0.035*		0.044*		0.328	
Family history of any cancer						
Absent	29 (49.2)	10 (62.5)	05 (29.4)	06 (75.0)	24 (57.1)	04 (50.0)
Present	30 (50.8)	06 (37.5)	12 (70.6)	02 (25.0)	18 (42.9)	05 (50.0)
<i>p</i> -value	0.343		0.032*		0.709	
Smoking status						
Smokers	47 (79.7)	13 (81.3)	14 (82.4)	07 (87.5)	33 (78.6)	06 (75.0)
Non-smokers	0 (0.0)	03 (18.7)	0 (0.0)	01 (12.5)	0 (0.0)	02 (25.0)
Ex-smokers	12 (20.3)	0 (0.0)	03 (17.6)	0 (0.0)	09 (21.4)	0 (0.0)
<i>p</i> -value	0.001*		0.169		0.002*	
Alcohol consumption						
Drinkers	37 (62.7)	07 (43.8)	12 (70.6)	03 (37.5)	25 (59.5)	04 (50.0)
Non-drinkers	03 (5.1)	02 (12.4)	01 (5.9)	01 (12.5)	02 (4.8)	01 (12.5)
Ex-drinkers	19 (32.2)	07 (43.8)	04 (23.5)	04 (50.0)	15 (35.7)	03 (37.5)
<i>p</i> -value	0.318		0.289		0.676	
Anatomic Sites						
Oral cavity	19 (32.2)	09 (56.2)	04 (23.5)	05 (62.5)	15 (35.7)	04 (50.0)
Oropharynx	19 (32.2)	03 (18.8)	09 (52.9)	02 (25.0)	10 (23.8)	01 (12.5)
Larynx	13 (22.0)	04 (25.0)	03 (17.7)	01 (12.5)	10 (23.8)	03 (37.5)
Hypopharynx	08 (13.6)	0 (0.0)	01 (5.9)	0 (0.0)	07 (16.7)	0 (0.0)
<i>p</i> -value	0.176		0.281		0.463	
TNM Clinical Staging						
I/II	06 (10.2)	03 (18.8)	02 (11.8)	01 (12.5)	04 (9.5)	02 (25.0)
III/IV	53 (89.8)	13 (81.2)	15 (88.2)	07 (87.5)	38 (90.5)	06 (75.0)
<i>p</i> -value	0.349		0.958		0.217	
Tumor Size						
T1/T2	13 (22.0)	07 (43.8)	04 (23.5)	04 (50.0)	09 (21.4)	03 (37.5)
T3/T4	46 (78.0)	09 (56.2)	13 (76.5)	04 (50.0)	33 (78.6)	05 (62.5)
<i>p</i> -value	0.081		0.186		0.329	
Locoregional Metastais						
Ausent	21 (35.6)	06 (37.5)	05 (29.4)	03 (37.5)	16 (38.1)	03 (37.5)
Present	38 (60.4)	10 (62.5)	12 (70.6)	05 (62.5)	26 (61.9)	05 (62.5)
<i>p</i> -value	0.888		0.686		0.975	
WHO Gradation						
I	17 (28.8)	02 (12.5)	02 (11.8)	02 (25.0)	15 (35.7)	0 (0.0)
II	18 (30.5)	06 (37.5)	09 (52.9)	03 (37.5)	09 (21.4)	03 (37.5)
III	24 (40.7)	08 (50.0)	06 (35.3)	03 (37.5)	18 (42.9)	05 (62.5)
<i>p</i> -value	0.413		0.646		0.126	

Variables	All patients (%)		Younger patients (%)		Older patients (%)	
	P16 methylation status		P16 methylation status		P16 methylation status	
	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Invasive Front Gradation						
Score 4-8	05 (8.5)	0 (0.0)	01 (5.9)	0 (0.0)	04 (9.5)	0 (0.0)
Score >8	54 (91.5)	16 (100.0)	16 (94.1)	08 (100.0)	38 (90.5)	08 (100.0)
<i>p</i> -value	0.288		0.489		0.363	
DNMT3B genotype						
CC	10 (16.9)	03 (18.8)	03 (17.6)	02 (25.0)	07 (16.7)	01 (12.5)
CT	41 (69.5)	11 (68.8)	11 (64.8)	06 (75.0)	30 (71.4)	05 (62.5)
TT	08 (13.6)	02 (12.5)	03 (17.6)	0 (0.0)	05 (11.9)	02 (25.0)
<i>p</i> -value	0.983		0.440		0.615	
Allele frequencies						
C allele	51 (86.4)	14 (87.5)	14 (82.4)	08 (100.0)	37 (88.1)	06 (75.0)
T allele	08 (13.6)	02 (12.5)	03 (17.6)	0 (0.0)	05 (11.9)	02 (25.0)
<i>p</i> -value	0.912		0.296		0.310	
DNMT3B immunohistochemistry*						
Mean Rank of positivity	37.90	28.9	12.81	10.14	25.31	20.44
<i>p</i> -value	0.133		0.384		0.368	

In bold: significant *p*-value<0.05

* Analyzed by Kruskal-Wallis Test, the others analyzes were done with X² test.

Table III - DNMT3B genotype and their association with P16^{CDKN2A} methylation and clinicopathological features in case and control HNSCC

Variables	All patients (%)			Younger patients (%)			Older patients (%)		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Gender									
Male	11 (84.6)	45 (86.5)	08 (80.0)	05 (100.0)	13 (76.5)	03 (100.0)	06 (75.0)	32 (91.4)	05 (71.4)
Female	02 (15.4)	07 (13.5)	02 (20.0)	0 (0.0)	04 (23.5)	0 (0.0)	02 (25.0)	03 (8.6)	02 (28.6)
<i>p</i> -value		0.864			0.326			0.235	
Family history of any cancer									
Absent	05 (38.5)	28 (53.8)	06 (60.0)	01 (20.0)	08 (47.1)	02 (66.7)	04 (50.0)	20 (57.1)	04 (57.1)
Present	08 (61.5)	24 (46.2)	04 (40.0)	04 (80.0)	09 (52.9)	01 (33.3)	04 (50.0)	15 (42.9)	03 (42.9)
<i>p</i> -value		0.527			0.395			0.933	
Smoking status									
Smokers	08 (61.5)	43 (82.7)	09 (90.0)	05 (100.0)	13 (76.5)	03 (100.0)	03 (37.5)	30 (85.7)	06 (85.7)
Non-smokers	01 (7.7)	02 (3.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	01 (5.9)	0 (0.0)	01 (12.5)	01 (2.9)	0 (0.0)
Ex-smokers	04 (30.8)	07 (13.5)	01 (10.0)	0 (0.0)	03 (17.6)	0 (0.0)	04 (15.0)	04 (11.4)	01 (14.3)
<i>p</i> -value		0.437			0.692			0.054	
Alcohol consumption									
Drinkers	05 (38.5)	30 (57.7)	09 (90.0)	02 (40.0)	10 (58.8)	03 (100.0)	03 (37.5)	20 (57.1)	06 (85.7)
Non-drinkers	01 (7.7)	04 (7.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	02 (11.8)	0 (0.0)	01 (12.5)	02 (5.7)	0 (0.0)
Ex-drinkers	07 (53.8)	18 (34.6)	01 (10.0)	03 (60.0)	05 (29.4)	0 (0.0)	04 (50.0)	13 (37.1)	01 (14.3)
<i>p</i> -value		0.165			0.367			0.425	
Anatomic Sites									
Oral cavity	06 (46.1)	20 (38.5)	02 (20.0)	02 (40.0)	06 (35.2)	01 (33.3)	04 (50.0)	14 (40.0)	01 (14.3)
Oropharynx	03 (23.1)	17 (32.7)	02 (20.0)	02 (40.0)	08 (47.1)	01 (33.3)	01 (12.5)	09 (25.7)	01 (14.3)
Larynx	03 (23.1)	09 (17.3)	05 (50.0)	01 (20.0)	02 (11.8)	01 (33.3)	02 (25.0)	07 (20.0)	04 (57.1)
Hypopharynx	01 (7.7)	06 (11.5)	01 (10.0)	0 (0.0)	01 (5.9)	0 (0.0)	01 (12.5)	05 (14.3)	01 (14.3)
<i>p</i> -value		0.438			0.964			0.515	
TNM Clinical Staging									
I/II	03 (23.1)	05 (9.6)	01 (10.0)	0 (0.0)	03 (17.6)	0 (0.0)	03 (37.5)	02 (5.7)	01 (14.3)
III/IV	10 (76.9)	47 (90.4)	09 (90.0)	05 (100.0)	14 (82.4)	03 (100.0)	05 (62.5)	33 (94.3)	06 (85.7)
<i>p</i> -value		0.401			0.448			0.043*	
Tumor Size									
T1/T2	07 (53.8)	12 (23.1)	01 (10.0)	01 (20.0)	07 (41.2)	0 (0.0)	06 (75.0)	05 (14.3)	01 (14.3)
T3/T4	06 (46.2)	40 (76.0)	09 (90.0)	04 (80.0)	10 (58.8)	03 (100.0)	02 (25.0)	30 (85.7)	06 (85.7)
<i>p</i> -value		0.036*			0.301			0.001*	
Locoregional Metastasis									
Absent	06 (46.2)	18 (34.6)	03 (30.0)	01 (20.0)	07 (41.2)	0 (0.0)	05 (62.5)	11 (31.4)	03 (42.9)
Present	07 (53.8)	34 (65.4)	07 (70.0)	04 (80.0)	10 (58.8)	03 (100.0)	03 (37.5)	24 (68.6)	04 (57.1)
<i>p</i> -value		0.677			0.301			0.253	
WHO Gradation									
I	02 (15.4)	14 (26.9)	03 (30.0)	02 (40.0)	02 (11.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	12 (34.3)	03 (42.9)
II	07 (53.8)	14 (26.9)	13 (30.0)	03 (60.0)	07 (41.1)	02 (66.7)	05 (40.0)	07 (20.0)	01 (14.2)
III	04 (30.8)	24 (46.2)	04 (40.0)	0 (0.0)	08 (47.1)	01 (33.3)	05 (40.0)	16 (45.7)	03 (42.9)
<i>p</i> -value		0.461			0.250			0.214	

Variables	All patients (%)			Younger patientts (%)			Older patientts (%)		
	CC	CT	TT	CC	CT	TT	CC	CT	TT
Invasive Front Gradation									
Score 4-8	01 (7.7)	04 (7.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	01 (5.9)	0 (0.0)	01 (12.5)	03 (8.6)	0 (0.0)
Score >8	12 (92.3)	48 (92.3)	10 (100.0)	05 (100.0)	16 (94.1)	03 (100.0)	07 (87.5)	32 (91.4)	07 (100.0)
<i>p</i> -value		0.662			0.783			0.656	
P16 Methylation Status									
Positive	10 (76.9)	41 (78.8)	08 (80.0)	03 (60.0)	11 (64.7)	03 (100.0)	07 (87.5)	30 (85.7)	05 (71.4)
Negative	03 (23.1)	11 (21.2)	02 (20.0)	02 (40.0)	06 (35.3)	0 (0.0)	01 (12.5)	05 (14.3)	02 (28.6)
<i>p</i> -value		0.983			0.440			0.615	
DMNT3B immunohistochemistry*									
Mean Rank of positivity	29.14	37.54	35.85	14.5	11.91	9.7	13.64	26.25	26.86
<i>p</i> -value		0.472			0.584			0.084	

In bold: significant *p*-value<0.05

* Analyzed by Kruskal-Wallis Test, the others analyzes were done with X² test.

Table IV - Survival analyzed by Cox regression in the HNSCC patients with a follow-up of 0-2500 days

Variables	All patients				Young patients				Older patients			
	<i>p</i> value	OR	95,0% CI		<i>p</i> value	OR	95,0% CI		<i>p</i> value	OR	95,0% CI	
			Lower	Upper			Lower	Upper			Lower	Upper
Age												
> 45 years old		Referent			-	-	-	-	-	-	-	-
≤45 years old	0.115	1.822	0.864	3.844	-	-	-	-	-	-	-	-
P16 Methylation												
Positive		Referent				Referent				Referent		
Negative	0.274	1.482	0.733	2.996	0.088	0.268	0.059	1.217	0.001	7.832	2.796	21.940
DNMT3B genotype												
CC		Referent				Referent				Referent		
CT	0.822	1.110	0.449	2.744	0.438	1.991	0.350	11.336	0.973	0.980	0.297	3.233
TT	0.871	1.096	0.362	3.318	0.327	0.286	0.023	3.496	0.824	1.168	0.297	4.595
TMN												
Early		Referent				Referent				Referent		
Late	0.029	5.022	1.175	21.470	0.985	NA	0.011	8.449	0.011	8.449	1.622	44.015
DNMT3B immunohistochemistry	0.753	1.141	0.501	2.597	0.583	0.666	0.156	2.848	0.079	2.623	0.894	7.696

In bold: significant *p*-value<0.05.

The term 'referent' is associated with categorical variables with a lower risk of developing the disease.

NA not aplicabe.

4 PRODUTOS ALCANÇADOS

4.2 Artigo científico II

Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization

A.M.B. De Paula ^{a,*}, L.R. Souza ^b, L.C. Farias ^b, G.T.B. Corrêa ^b, C.A.C. Fraga ^b, N.B. Eleutério ^b, A.C.O. Silveira ^b, F.B.G. Santos ^c, D.S. Haikal ^a, A.L.S. Guimarães ^a, R.S. Gomez ^d.

^a Department of Dentistry, State University of Montes Claros, Montes Claros, Brazil

^b Department of Dentistry and Biological Sciences, State University of Montes Claros, Montes Claros, Brazil

^c Department of Medicine – Head and Neck Surgery. State University of Montes Claros, Montes Claros, Brazil

^d Department of Clinic, Pathology and Surgery, School of Dentistry. Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Oral Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/oraloncology

Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization

A.M.B. De Paula^{a,*}, L.R. Souza^b, L.C. Farias^b, G.T.B. Corrêa^b, C.A.C. Fraga^b, N.B. Eleutério^b, A.C.O. Silveira^b, F.B.G. Santos^c, D.S. Haikal^a, A.L.S. Guimarães^a, R.S. Gomez^d

^aDepartment of Dentistry, State University of Montes Claros, Montes Claros, Brazil

^bDepartment of Dentistry and Biological Sciences, State University of Montes Claros, Montes Claros, Brazil

^cDepartment of Medicine – Head and Neck Surgery, State University of Montes Claros, Montes Claros, Brazil

^dDepartment of Clinic, Pathology and Surgery, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2008

Received in revised form 26 November 2008

Accepted 27 November 2008

Available online xxxx

Keywords:

Squamous cell carcinoma

Head and neck

Epidemiology

Young people

Risk factors

p53 Protein

Immunohistochemical

Prognostic

SUMMARY

This study evaluated 724 primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in young and old patients, with regard to clinical profile and immunohistochemical expression of p53 protein. Associations among age, epidemiological and clinicopathological parameters, and survival analysis were evaluated. HNSCC in young people occurred in 14.5% (median age 40.7 years; male-to-female ratio 5.9:1). A statistical association was demonstrated between age and family history of cancer, and between age and anatomical site. Among older patients, a higher presence of disease was noted in posterior sites. Expression of p53 was found in 71.7% of the samples and a higher expression was noted in lesions of young patients. Survival analysis showed that the age parameter is not a reliable prognostic factor for HNSCC. Among young patients, cervical metastasis was associated with worse survival. The presence of a family history of cancer in young patients could indicate genetic susceptibility and molecular disturbances in the p53 pathway in HNSCC of young and older patients seem to be distinct.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Head and neck squamous cell carcinoma is a disease associated with major morbidity and mortality and represents a major worldwide public health problem in many countries, including Brazil.^{1,2} The incidence of the disease varies according to geographic area and social and economic patterns.²

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) arises as a consequence of multiple molecular events induced by the effects of various carcinogens from habits such as tobacco and alcohol use, influenced by other environmental factors against a background of inherited resistance or susceptibility.³ Genetic influences on HNSCC have been found in certain cases, but the components are not yet entirely clear.^{4,5}

The HNSCC is rare in patients under the age of 45 years, being primarily a disease that occurs in males in their sixth and seventh decades.⁶ Recent studies have observed an increased incidence of HNSCC in the younger population in several countries of the world.^{6,7} It was estimated that about 3% of HNSCC occur in young

patients, but an increase has recently been recognized.^{6,8} It is unclear why some people developed HNSCC at a young age and the pathogenesis of the disease in this group of patients has not yet been elucidated. The initial studies demonstrated that HNSCC in young patients have a poor prognosis, comparable to that for tumors in older patients, which suggests that they represent a more aggressive form of the disease.⁹ Tobacco and alcohol, which are the most recognized extrinsic etiological agents for HNSCC in older patients, were not so prevalent and thus may not contribute to head and neck carcinogenesis in young patients,^{6,10,11} suggesting that HNSCC in young people could have distinct molecular mechanisms.^{9,10,12}

The aim of the present retrospective, case control study was to delineate the epidemiological risk factors and outcome of young patients with HNSCC in a Brazilian sample, and compare them with those of HNSCC cases in older patients. Moreover, we attempted to evaluate whether p53 protein expression is age-dependent in HNSCC.

Patients and methods

Patients

The study group was a series of 724 fully reviewed cases of primary HNSCC that had been confirmed histologically in patients

* Corresponding author. Address: Departamento de Odontologia, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes, Av. Dr. Rui Braga, s/n. Vila Mauricéia, Montes Claros – MG, Brazil. Tel.: +51 21 38 32248327; fax: +55 21 38 32245396.

E-mail address: ambpatologi@gmail.com (A.M.B. De Paula).

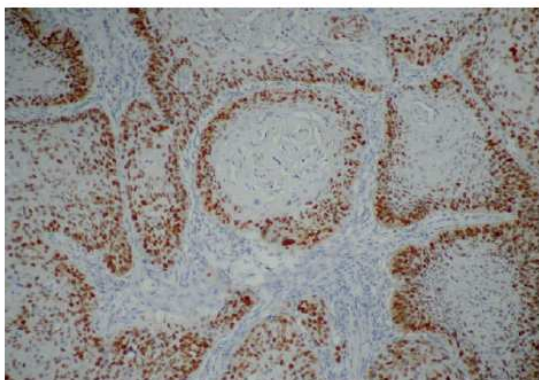


Figure 1 Strong nuclear immunostaining of p53 protein in islands of the invasive front of HNSCC (LSAB/DAB, Original magnification of $\times 100$).

who were treated between 1998 and 2006, in head and neck surgery public services in Montes Claros city, Minas Gerais state, Brazil (Fig. 1). The exclusive protocol for the majority of patients included surgical resection together with postoperative radiotherapy. The health records of these patients were retrieved and demographic, social, clinical, and outcome data were analyzed. The group of young patients consisted of subjects who were aged 45 years or less. Ethical approval for this study was obtained from the local ethics committees (Unimontes/COEP, 167/2005).

Clinical staging and anatomical site

All patients were staged according to the UICC TNM Classification of Malignant Tumors (1997).¹³ HNSCC was classified according to the primary site as described in the International Classification of Diseases (ICD-10) for Oncology. The anatomical sites reviewed in this study included: (1) mouth and perioral region (C00, C01, C02, C04, C05, C06.0, C06.2); (2) oropharynx (C09–C10); and (3) hypopharynx–Larynx (C12, C13, C32). Lesions located in the oral cavity were considered as the anterior group and those located in the oropharynx–hypopharynx–larynx as the posterior group.

Definitions of terms used for alcohol drinking and tobacco habits, familial history of cancer, and ethnicity

The habit of drinking and the average overall daily drink intake of alcohol, beer and *cachaça*, a very popular and inexpensive sugar cane spirit with a 35–45% ethyl alcohol content, were investigated. A can of light beer (i.e., 330 ml) or a drink of *cachaça* (i.e., 40 ml) contains 12 g of ethanol. Patients were classified as “ever” drinkers if they had had at least 12 drinks (120 g of ethanol) over the previous 12 months and as “never” drinkers if they had not consumed at least 12 drinks in their life. The alcohol-drinking habit was classified as moderate or heavy drinking. Heavy drinking was defined as a pattern of drinking that is often defined in terms of exceeding a certain daily volume (e.g., three drinks/day), or quantity per occasion (e.g., five drinks on an occasion, at least once a week), or daily drinking.

The tobacco habit and the average daily consumption of cigarettes were investigated. Only those patients who had never smoked were considered non-smokers. Ex-drinkers and ex-smokers were subjects who had abstained from any type of drinking and smoking for at least one year. In some situations, patients who were smokers/ex-smokers and drinkers and ex-drinkers were grouped together.

All patients were asked about the occurrence of cancer in a first-degree relative. The term cancer was defined using the WHO definition of “an uncontrolled growth and spread of cells that may affect almost any tissue of the body”. Although, ethnicity could not be truly established in Brazilian people,¹⁴ all the subjects were classified as white and non-white.

Immunohistochemistry method

After the histopathological analysis of all tumors, 106 cases were selected. Both groups (younger and older) were matched according to sex, alcohol and tobacco habits, and TNM stage. The primary antibody against p53 protein (mouse monoclonal anti-p53, clone DO7, Novocastra Lab., Newcastle, UK) was detected by the LSAB kit (DAKO, Denmark). Negative controls were performed by replacing the primary antibody with phosphate-buffered saline. A biopsy sample of HNSCC that was previously shown to be p53-positive was used as a positive control. Only cells that presented nuclear brown-colored staining in neoplastic cells were considered positive, regardless of the staining intensity. Positive p53 expression was defined when more than 10% of cells stained positively.¹⁵

Statistical analysis

The possible associations among epidemiological and clinicopathological parameters and age-dependent groups were examined using the χ^2 test with Fisher’s exact test. Statistical analysis showing confidence interval above 95% ($p < 0.05$) was considered significant. The results of Kaplan-Meier analysis were compared using the log-rank test. Variables with $p \leq 0.25$ alongside age were included in the Cox proportional hazards regression to estimate predictive factors of crude survival. The model was adjusted to the best significance. The variables examined were those recorded at the time of diagnosis. The term referent is associated with categorical variables with a lower risk of developing the disease, according to the literature. The records of each patient were reviewed, considering the same parameters, for 0–3550 days (including censored patients) and for 0–1095 days (without including censored patients). All statistical analyses were performed with the statistical pack SPSS® (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), version 13.0 for Windows®.

Results

The male-to-female ratio was 5.9:1 with a mean age of 59.64 years (ranging from 21 to 92 years). Table 1 shows the distribution of the HNSCC cases according to the anatomical site. There were 105 (14.5%) patients who were under 45 years. In this group, the male-to-female ratio was 6:1 and the mean age was 40.7 years (range 21–45 years). In the older group, the male-to-female ratio was 5.9:1 and the mean age was 62.9 years (range 46–92 years).

Table 2 shows the comparative analysis of the epidemiological data, risk factors, and clinical data between young and old patients. The distribution of patients according to gender, ethnicity, TNM, T and N parameters, symptoms, and tobacco and alcohol-drinking habits were similar ($p > 0.05$). A significant association between age and family history of cancer, and between age and anatomical site parameters ($p < 0.05$) was observed. In the young population, a higher occurrence of family history of cancer was observed. In the older group, a higher presence of disease was noted in the posterior areas of the head and neck (Table 2). The expression of p53 in HNSCC was found in 71.7% of all samples (Fig. 1). A significantly higher expression of p53 was found in squamous cell carcinoma samples of young patients ($p < 0.05$) (Table 2).

Table 1
Distribution of HNSCC samples according anatomical site.

Anatomical site	All n (%)	Young n (%)	Older n (%)
<i>Oral cavity</i>	242 (33.4)	46 (43.8)	196 (31.8)
Tongue (oral)	88 (36.4)	22 (47.8)	66 (33.7)
Palate (hard and anterior soft)	17 (7.0)	2 (4.3)	15 (7.6)
Gum	9 (3.7)	1 (2.2)	8 (4.1)
Retromolar trigone	22 (9.1)	2 (4.3)	20 (10.2)
Upper lip	5 (2.1)	1 (2.2)	4 (2.0)
Lower lip	30 (12.4)	6 (13.1)	24 (12.3)
Mucosa buccal	8 (3.3)	0 (0)	8 (4.1)
Floor of mouth	63 (26.0)	12 (26.1)	51 (26.0)
<i>Oropharynx</i>	223 (30.8)	31 (29.5)	192 (31.0)
Tongue (base)	99 (44.4)	13 (42.0)	86 (44.8)
Palate soft (posterior)	47 (21.1)	5 (16.1)	42 (21.9)
Tonsils (fossa and pillars)	54 (24.2)	11 (35.5)	43 (22.4)
Uvula	4 (1.8)	0 (0)	4 (2.1)
Vallecula	6 (2.7)	2 (6.4)	4 (2.1)
Anterior wall	13 (5.8)	0 (0)	13 (6.7)
<i>Hypopharynx-larynx</i>	259 (35.8)	28 (26.6)	231 (37.2)
Piriform sinus	51 (19.7)	10 (35.7)	41 (17.8)
Cricoid posterior area	4 (1.5)	0 (0)	4 (1.7)
Posterior pharynx	15 (5.8)	2 (7.1)	13 (5.6)
larynx	189 (73.0)	16 (57.2)	173 (74.9)
All	724 (100%)	105 (14.5%)	619 (85.5%)

Follow-up ranged from 0 to 3550 days (median 498.5 days). Curves illustrating the rate of survival according to the age parameter in 1095 and 3550 days are shown in Fig. 2 (A and B, respectively). The Cox regression showed that cervical metastasis (OR 2.336 and OR 2.150 for 1095 and 3550 days of follow-up, respectively) and TNM (OR 3.214 and OR 3.770 for 1095 and 3550 days of follow-up) parameters were associated with a worse survival. For older patients, cervical metastasis (OR 2.115 and OR 1.784 for 1095 and 3550 days of follow-up) and TNM (OR 3.699 and OR 4.499 for 1095 and 3550 days of follow-up) parameters were associated with worse survival. Among young patients, only the cervical metastasis parameter was associated with worse survival (OR 3.471 and OR 4.329 for 1095 and 3550 days of follow-up, respectively) (Tables 3 and 4).

Discussion

Smoking and alcohol-drinking habits are very common in Brazil and are frequently associated with unfavorable socio-economic conditions. These habits occur at an early age among the Brazilian population.^{16,17} Interestingly, Brazil has the highest *per capita* consumption of tobacco and alcohol among all the countries in Latin America.^{17–19} Most of the knowledge on the traditional risk factors in HNSCC, tobacco, and alcohol, relate to middle aged and elderly populations²⁰ and these factors have similar effects on various head and neck subsites. However, the carcinogenic action may be somewhat weaker or stronger depending on the anatomical site. A growing amount of evidence demonstrates the expressive contribution of these habits to HNSCC development among young subjects.^{10,21} In this study, we found similar evidence. An interesting aspect refers to the possibly short time span it takes for tobacco and alcohol to exert a detrimental effect on head and neck carcinogenesis in young patients,^{6,22} especially if we consider that the latency between carcinogen exposure and the appearance of malignancy may be as long as 25 years.²³ However, the analysis of our results showed that the majority of young patients had a long history of tobacco and alcohol consumption. Although, some studies report a possible lack of association between these risk factors and HNSCC in young patients,²⁴ other potential factors have been intensively investigated.^{10,17,20,25} Of interest, the role of human papillomavirus (HPV) infection in HNSCC has gained signifi-

Table 2
Distribution and analysis of epidemiological, risk factors, clinical parameters, and p53 expression in the HNSCC, according to age.

Variables	All n (%)	Young n (%)	Older n (%)	p value
<i>Gender</i>				
Female	104 (14.4)	15 (14.3)	89 (14.4)	0.56
Male	620 (85.6)	90 (85.7)	530 (85.6)	
<i>Ethnicity</i>				
White	195 (26.9)	24 (22.9)	171 (27.6)	0.18
Non-white	529 (73.1)	81 (77.1)	448 (72.4)	
<i>Cancer family history</i>				
Absent	449 (62.0)	46 (43.8)	403 (65.1)	0.00*
Present	275 (38.0)	59 (56.2)	216 (34.9)	
<i>Symptoms</i>				
Absent	27 (3.7)	4 (3.8)	23 (3.7)	0.06
Present	697 (96.3)	100 (96.2)	597 (96.3)	
<i>Anatomical site</i>				
Anterior	242 (33.4)	46 (43.8)	196 (31.7)	0.01*
Posterior	482 (66.6)	59 (56.2)	423 (68.3)	
<i>T parameter</i>				
T1/T2	212 (29.3)	32 (30.5)	180 (29.1)	0.42
T3/T4	512 (70.7)	73 (69.5)	439 (70.9)	
<i>N parameter</i>				
N0	314 (43.4)	40 (38.1)	274 (44.3)	0.14
N1.N2.N3	410 (56.6)	65 (61.9)	345 (55.7)	
<i>TNM</i>				
I/II	138 (19.1)	22 (21.0)	116 (18.7)	0.33
III/IV	586 (80.9)	83 (79.0)	503 (81.3)	
<i>Tobacco habit</i>				
Ever	663 (91.6)	94 (89.5)	569 (91.9)	0.26
Never	61 (8.4)	11 (10.5)	50 (8.1)	
<i>Quantity tobacco</i>				
≤10 Cigarettes/day	284 (56.0)	48 (57.8)	236 (55.7)	0.40
>10 Cigarettes/day	223 (44.0)	35 (42.2)	188 (44.3)	
<i>Alcohol drink habit</i>				
Ever	626 (86.5)	93 (88.6)	533 (86.1)	0.30
Never	98 (13.5)	12 (11.4)	86 (13.9)	
<i>Drinker grade</i>				
Moderately	118 (29.5)	21 (29.6)	97 (29.5)	0.54
Heavy	282 (70.5)	50 (70.4)	232 (70.5)	
<i>p53 Expression</i>				
Positive	76 (71.7)	41 (80.4)	35 (63.6)	0.04*
Negative	30 (28.3)	10 (19.6)	20 (36.4)	

All values were calculated using the χ^2 test. n.s.: not significant.

* Results statistically significant.

cant attention, whereby the oropharynx in particular has been appointed as the site most frequently associated with HPV infection.^{26,27} Some interesting studies have shown that patients with HPV-positive HNSCC tend to be younger than HPV-negative HNSCC patients.^{28–30} The recent development of HPV vaccines is an important step toward decreasing the risk of HPV infection in young adults and subsequently the risk of developing HPV-related malignancies such as HNSCC.³⁰

In this study, a late TNM stage during diagnosis was noted for young and older patients. Although, screening for premalignant lesions and early HNSCC has been part of the curriculum of the dental schools in Brazil, there are complex barriers before patient referral for treatment. The social inequalities among geographic regions and population groups are striking and access to diagnosis and treatment can be very difficult in some areas and for specific groups.¹⁷ An expressive incidence of disease in the posterior region of the head and neck of older patients could indicate express negligence on the part of these individuals by not seeking health services for routine examinations. Additionally, it is very complex for all patients to examine themselves and to identify lesions in sites of difficult visualization, even in sites such as the floor of the

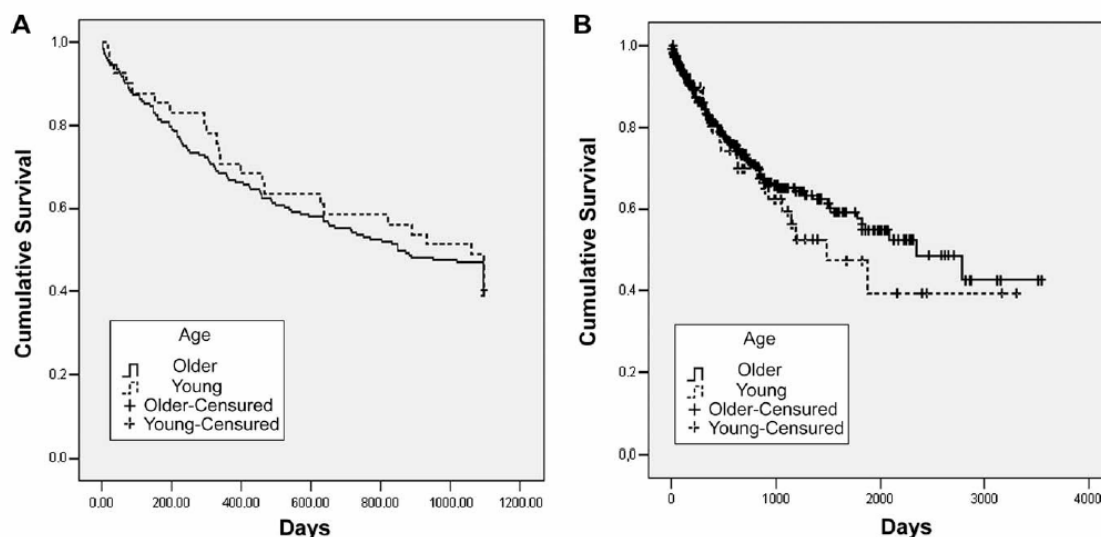


Figure 2 Survival in patients with HNSCC according to age after 1095 (A) and 3550 (B) days. The difference between the two groups was evaluated by the log-rank test and the differences were not statistically significant.

Table 3

Cox regression analyses in the HNSCC patients with a follow-up of 1095 days, without censored cases.

Variables	95% CI														
	All patients					Young patients					Older patients				
	n	OR	Lower	Upper	p value	n	OR	Lower	Upper	p value	n	OR	Lower	Upper	p value
Gender															
Female	32	Referent				5	Referent				27	Referent			
Male	190	1.182	0.650	2.151	0.584	32	3.337	0.388	28.688	0.272	154	1.034	0.549	1.945	0.918
Age															
Older	181	Referent				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Young	41	0.871	.561	1.351	0.536	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcohol drink habit															
Never	23	Referent				-	-	-	-	-	20	Referent			
Ever	199	3.448	0.761	1.620	0.211	-	-	-	-	-	161	1.730	0.764	3.917	0.188
Skin color															
Non-white	-	-	-	-	-	23	Referent				-	-	-	-	-
White	-	-	-	-	-	14	0.736	0.293	1.845	0.513	-	-	-	-	-
Family history of cancer															
Absent	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	233	Referent			
Present	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	158	1.253	0.854	1.839	0.249
Anatomical site															
Anterior	75	Referent				16	Referent				58	Referent			
Posterior	147	1.399	.955	2.051	0.085	21	1.645	0.657	4.120	0.288	123	1.359	0.881	2.098	0.166
T parameter															
T1/T2	68	Referent				09	Referent				59	Referent			
T3/T4	154	1.061	.655	1.718	0.810	28	1.013	0.267	3.840	0.984	122	0.981	0.579	1.660	0.942
N parameter															
N0	92	Referent				12	Referent				80	Referent			
N1.N2.N3	130	2.336	1.525	3.579	0.000*	25	3.471	1.000	12.047	0.050*	101	2.115	1.334	3.354	0.001*
TNM															
I/II	36	Referent				05	Referent				30	Referent			
III/IV	186	3.214	1.225	8.436	0.018*	32	NA				151	3.699	1.278	10.706	0.016*

OR: odds ratio; CI: confidence interval; n: total number. The model was fitted to the best-fit model.

* Results statistically significant.

mouth. Still, a lower standard of care by professionals in analyzing these areas can aggravate this situation. The late diagnosis of HNSCC will usually result in a worse outcome for patients with the disease.^{7,8,28-30} In the current study, however, the

anatomical site parameter did not show any association with survival.

A consistent amount of evidence suggests that some molecular alterations might be associated with onset, development, and clin-

Table 4
Cox regression analyses in the HNSCC patients with a follow-up of 3550 days, with censored cases.

Variables	95% CI														
	All patients					Young patients					Older patients				
	n	OR	Lower	Upper	p value	n	OR	Lower	Upper	p value	n	OR	Lower	Upper	p value
<i>Gender</i>															
Female	62	Referent				10	Referent				-	-	-	-	-
Male	402	1.137	0.622	2.078	0.676	63	3.977	0.438	36.084	0.220	-	-	-	-	-
<i>Age</i>															
Older	391	Referent				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Young	73	1.182	0.761	1.836	0.457	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alcohol drink habit</i>															
Never	54	Referent				-	-	-	-	-	48	Referent			
Ever	410	1.412	0.67	2.978	0.365	-	-	-	-	-	343	1.465	0.701	3.062	0.343
<i>Family history of cancer</i>															
Absent	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	233	Referent			
Present	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	158	1.253	0.854	1.839	0.249
<i>Anatomical site</i>															
Anterior	156	Referent				34	Referent				121	Referent			
Posterior	308	1.268	0.864	1.862	0.225	39	1.913	0.795	4.601	0.147	270	1.229	0.797	1.895	0.351
<i>T parameter</i>															
T1/T2	148	Referent				21	Referent				128	Referent			
T3/T4	316	1.122	0.696	1.810	0.637	52	1.006	0.290	3.486	0.993	263	1.021	0.52	1.712	0.937
<i>N parameter</i>															
N0	207	Referent				26	Referent				182	Referent			
N1.N2.N3	257	2.150	1.399	3.303	0.000*	47	4.329	1.318	14.226	0.016*	209	1.784	1.118	2.847	0.015*
<i>TNM</i>															
I/II	94	Referent				15	Referent				79	Referent			
III/IV	370	3.770	1.424	9.985	0.008*	58	2.741	0.290	25.873	0.379	312	4.499	1.531	13.223	0.006*

OR: odds ratio; CI: confidence interval; n: total number. The model was fitted to the best-fit model.

* Results statistically significant.

ical behavior of HNSCC,⁶ and seem to contribute to the disease in older and young patients similarly.^{21,31,32} Molecular alterations at the p53 gene have been documented as being the most frequent genetic alteration observed in carcinomas.³³ A previous study suggested the absence of p53 alteration in HNSCC of young patients. We identified higher p53 protein expression in samples of HNSCC in young patients. As young and older patients had similar risk patterns (tobacco and alcohol use), and these habits are known to be strongly correlated with alterations in the p53 gene,^{34–36} our results suggest distinct molecular abnormalities in the p53 pathway in HNSCC of young and older patients. Molecular studies are needed to further confirm this assumption.

In a comprehensive review, Llewellyn et al.⁶ suggested that only a small proportion of individuals exposed to potential carcinogens might develop the disease and that intrinsic susceptibility to this environmental exposure might play a role in head and neck cancer. Moreover, the onset of HNSCC at an early age represents a relevant indicator of hereditary cancer.³⁷ Similar to other works,^{37,38} our results showed a higher occurrence of cancer in the first-degree relatives of young patients. Inherited p53 mutations in some families underlie some cases of HNSCC.^{3,39} Further studies are necessary to clarify the participation of disturbances in the p53 pathway as promoters of inherited genomic instability in HNSCC of young patients.

Survival trends for HNSCC have shown little change during the last few decades worldwide.⁴¹ Several conflicts may arise while discussing whether age determines the outcome in patients with HNSCC.^{7,37,38,40} In the current study, younger and older groups had similar results for gender, race, and TNM, which make the results strictly related to age. Our results showed that the age parameter is not an indicator of aggressiveness of HNSCC in young people. Among the variables used for survival analysis in this study, just the TNM and N parameters significantly affected survival in a proportional hazards model. Among young patients, the

N parameter was the only predictor of survival. The participation of these parameters as predictors of survival in HNSCC has already been reported in other studies.^{7,8,40} The adequate performance of treatment in patients with primary HNSCC could impact significantly on outcome. An aggressive primary treatment of HNSCC with an appropriate regional lymphadenectomy, may be used for all patients, independent of age, and, thus, the mortality rate could be potentially reduced.

In conclusion, despite the lower incidence of HNSCC in young people, relevant clinical parameters and traditional risk factors for disease showed a similar profile to that of older patients. Higher p53 expression in samples of young patients and a higher number of individuals with a family history of cancer suggests that genetic disturbance of the p53 pathway might have been significantly involved in the early presentation of the disease, even if alcohol and/or tobacco use also plays a role. Analysis of relative survival suggested that age was not an independent predictor of survival in HNSCC in young people.

Acknowledgment

This study was supported by the Foundation for the Support of Research of Minas Gerais State (Fapemig).

References

1. Franceschi S, Levi F, La VC, Conti E, Dal ML, Barzan L, et al. Comparison of the effect of smoking and alcohol drinking between oral and pharyngeal cancer. *Int J Cancer* 1999;**83**(1):1–4.
2. Antunes JL, Biazovic MG, de Araujo ME, Tomita NE, Chinellato LE, Narvai PC. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in Sao Paulo, Brazil, 1980–1998. *Oral Oncol* 2001;**37**(4):345–50.
3. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 2000;**36**(4):311–27.
4. Drummond SN, De ML, Noronha JC, Gomez RS. GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2004;**40**(1):52–5.

5. Schantz SP, Hsu TC, Ainslie N, Moser RP. Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage. *JAMA* 1989;262(23):3313–5.
6. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Wamakulasuriya KA. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol* 2003;39(2):106–14.
7. Wamakulasuriya S, Mak V, Moller H. Oral cancer survival in young people in South East England. *Oral Oncol* 2007;43(10):982–6.
8. Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122(1):44–51.
9. Sarkania JN, Harari PM. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. *Head Neck* 1994;16(2):107–11.
10. Llewellyn CD, Johnson NW, Wamakulasuriya S. Factors associated with delay in presentation among younger patients with oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(6):707–13.
11. Mendez Jr P, Maves MD, Panje WR. Squamous cell carcinoma of the head and neck in patients under 40 years of age. *Arch Otolaryngol* 1985;111(11):762–4.
12. Atula S, Grenman R, Laippala P, Syrjanen S. Cancer of the tongue in patients younger than 40 years. A distinct entity? *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996;122(12):1313–9.
13. Sobin LH. TNM: evolution and relation to other prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2003;21(1):3–7.
14. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(1):177–82.
15. Thongsuksai P, Boonyaphiphat P. Lack of association between p53 expression and betel nut chewing in oral cancers from Thailand. *Oral Oncol* 2001;37(3):276–81.
16. Koifman S, Koifman RJ. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res* 2003;544(2–3):305–11.
17. Wunsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002;38(8):737–46.
18. Carlini-Marlatt B. "A população é jovem e o país é quente": estimativas de consumo de álcool e tabaco no Brasil pelos dados das indústrias produtoras. *J Bras Dep Quim* 2001;2(10):3–8.
19. da Costa e Silva VL, Koifman S. Smoking in Latin America: a major public health problem. *Cad Saude Pub* 1998;14(Suppl 3):99–108.
20. La VC, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol* 1997;33(5):302–12.
21. Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran AG, Birch J, et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol* 2000;36(4):387–9.
22. Slotman GJ, Swaminathan AP, Rush Jr BF. Head and neck cancer in a young age group: high incidence in black patients. *Head Neck Surg* 1983;5(4):293–8.
23. Almadori G, Bussu F, Cadoni G, Galli J, Paludetti G, Maurizi M. Molecular markers in laryngeal squamous cell carcinoma: towards an integrated clinicobiological approach. *Eur J Cancer* 2005;41(5):683–93.
24. Verschuur HP, Irish JC, O'Sullivan B, Goh C, Gullane PJ, Pintilie M. A matched control study of treatment outcome in young patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope* 1999;109(2 Pt 1):249–58.
25. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995;121(2):157–60.
26. Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3187–92.
27. Sisk EA, Soltys SG, Zhu S, Fisher SG, Carey TE, Bradford CR. Human papillomavirus and p53 mutational status as prognostic factors in head and neck carcinoma. *Head Neck* 2002;24(9):841–9.
28. 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.
29. 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.
30. Gillison ML. Human papillomavirus-related diseases: oropharynx cancers and potential implications for adolescent HPV vaccination. *J Adolesc Health* 2008;43(Suppl 4):S52–60.
31. Jin YT, Myers J, Tsai ST, Goepfert H, Batsakis JG, el-Naggar AK. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma of young adults. *Oral Oncol* 1999;35(3):251–6.
32. Schantz SP, Byers RM, Goepfert H, Shallenberger RC, Beddingfield N. The implication of tobacco use in the young adult with head and neck cancer. *Cancer* 1988;62(7):1374–80.
33. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54(18):4855–78.
34. 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.
35. Field JK, Pavelic ZP, Spandidos DA, Stambrook PJ, Jones AS, Gluckman JL. The role of the p53 tumor suppressor gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;119(10):1118–22.
36. Field JK, Zoumpourlis V, Spandidos DA, Jones AS. P53 expression and mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck: expression correlates with the patients' use of tobacco and alcohol. *Cancer Detect Prev* 1994;18(3):197–208.
37. Lynch HT, Fusaro RM, Lynch J. Hereditary cancer in adults. *Cancer Detect Prev* 1995;19(3):219–33.
38. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH. Systematic population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of cancer probands. *J Natl Cancer Inst* 1994;86(21):1600–8.
39. Trizna Z, Schantz SP. Hereditary and environmental factors associated with risk and progression of head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am* 1992;25(5):1089–103.
40. Lacy PD, Piccirillo JF, Merritt MG, Zequeira MR. Head and neck squamous cell carcinoma: better to be young. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122(2):253–8.
41. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988;48(11):3282–7.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É sabidamente estabelecida a grande influência de alterações genéticas e agentes ambientais no carcinoma epidermóide da região de cabeça e pescoço. Estudos têm enfatizado as modificações epigenéticas como fatores relevantes no mecanismo da doença, podendo levar a alterações *de novo* ou agir como precipitador de alterações genéticas. No entanto, não há um conhecimento preciso da importância dos fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, em relação a diferentes faixas etárias de acometimento, tendo em vista o crescente aumento da incidência em adultos jovens. Polimorfismos genéticos e metilação de genes envolvidos no controle do ciclo celular podem estar associados ao desenvolvimento e risco para o câncer de cabeça e pescoço. Nesse estudo, buscou-se verificar a associação entre o polimorfismo DNMT3B (C46359T), metilação do gene P16^{CDKN2A}, idade e demais parâmetros clínico-patológicos da doença. Embora não tenha sido identificada associação significativa entre os parâmetros moleculares, sugere-se, em conformidade com outros estudos, que fatores diversos podem ter influência na carcinogênese, talvez, exercendo efeitos distintos em relação à idade. Cogita-se, ainda, a hipótese de que outros polimorfismos no mesmo gene, já descritos anteriormente, possam estar associados a diferentes padrões de metilação do gene P16^{CDKN2A}, além da influência de fatores exógenos importantes, como o tabagismo e as infecções pelo vírus HPV, cuja manifestação tem sido cada vez mais precoce.

Verificou-se, nesse estudo, que o polimorfismo DNMT3B (C34659T) ou a metilação do gene P16^{CDKN2A}, em análises isoladas, mostrou um impacto em diferentes parâmetros clínico-patológicos, principalmente em relação tabagismo, histórico de câncer na família e estadiamento clínico da lesão. Tendo em vista a

complexidade da doença e a necessidade de um maior entendimento dos mecanismos envolvidos em diferentes faixas etárias, mais estudos são necessários para investigar se o câncer de cabeça e pescoço, especialmente em adultos jovens, envolve aspectos distintos, tanto em sua etiopatogênese como no comportamento biológico.

REFERÊNCIAS

1. Döbrossy L. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer Metastasis Rev.* 2005;24(1):9-17.
2. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet.* 2008;371(9625):1695-709.
3. Scully C, Fiel JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000;36:256-263.
4. Scully C, Porter S. Oral cancer. *West J Med.* 2001;174(5):348-351.
5. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002;52(4):195-215.
6. Oliver AJ, Helfrick JF, Gard D. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996; 54(8):949-954.
7. Krutchkoff DJ, Chen JK, Eisenberg E, Katz RV. Oral cancer: a survey of 566 cases from the University of Connecticut Oral Pathology Biopsy Service, 1975-1986. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;70(2):192-198.
8. Bryne M, Nielsen K, Koppang HS, Dabelsteen E. Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. *J Oral Pathol Med.* 1991;20(8):369-72.
9. Tan LKS, Ogden GR. p53 over-expression in laryngeal carcinoma is not predictive of response to radiotherapy. *Oral Oncol.* 1997;33(3):177-181.
10. Kannan K, Latta PN, Shanmugam G. Expression of bcl-2 oncoprotein in Indian oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 1998;34(5):373-376.
11. Tsuchiya K, Shirato H, Nishioka T, Yamazaki A, Hashimoto S, Kagei K, Oomori K, Yasuda M, Shindo M, Miyasaka K. Pretreatment apoptotic scores do not predict response to radiation therapy in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2001;37(2):159-63.
12. Shen H, Wang L, Spitz MR, Hong WK, Mao L, Wei Q. A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res.* 2002;62(17):4992-4995.
13. Grabenbauer GG, Suckorada O, Niedobitek G, Rödel F, Iro H, Sauer R, Rödel C, Schultze-Mosgau S, Distel L. Imbalance between proliferation and apoptosis may be responsible for treatment failure after postoperative radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Oral Oncol.* 2003;39(5):459-69.

14. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.
15. Argiris A, Eng C. Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. *Cancer Treat Res.* 2003;114:15-60.
16. National Cancer Institute. Ministry of Health. Estimate 2008: Brazilian cancer incidence. - Rio de Janeiro: NCI, 2007 [cited 2007 Out 25]. Available from:<http://www.inca.gov.br/regpop/2007>.
17. Alvarenga LM, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC, R MJC, Maniglia JV, Goloni-Bertollo M. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2008;74:68-73.
18. Wei Q, Shen H, Spitz MR, Sturgis EM, Shields PG. Head and neck cancers. "Cancer risk assessment". Shields PG (ed) Taylor & Francis, Boca Raton, pp 475-501, 2005
19. Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;122(1):44-51.
20. Llewellyn CD, Linklater K, Bell J, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol.* 2003;39(2):106-14.
21. Manuel S, Raghavan SK, Pandey M, Sebastian P. Survival in patients under 45 years with squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32:167-173.
22. Gawecki W, Kostrzevska-Poczekaj M, Gajecka M, Milecki P, Szyfter K, Szyfter W. The role of genetic factor in etiopathogenesis of squamous cell carcinoma of the head and neck in young adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2007;264(12):1459-65.
23. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Síntese dos indicadores sociais 2003. IBGE: Brasília; 2004. 407p. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Síntese dos indicadores sociais 2003. IBGE: Brasília; 2004. 407p.
24. Garavello W, Spreafico R, Gaini RM. Oral tongue cancer in young patients: a matched analysis. *Oral Oncol.* 2007;43(9):894-7.
25. Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, Udagama MN, Ogawa I, Kudo Y et al. Analysis of histopathological and immunohistochemical differences of oral squamous cell carcinoma in young and old patients in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med.* 2007;36(6):357-62.

26. De Paula AMB, Souza LR, Farias LC, Corrêa GT, Fraga CA, Eleutério NB, Silveira AC, Santos FB, Haikal DS, Guimarães AL, Gomez RS. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral Oncol*. In press 2009.
27. Iamarrom A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak SW, Prapayasatok S, Jittidecharaks S, et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *IntJ Oral Maxillofac Surg*. 2004;33:84-8.
28. Warnakulasuriya S, Mak V, Moller H. Oral cancer survival in young people in South East England. *Oral Oncol*. 2007;43(10):982-6.
29. Zender CA, Petruzzelli GJ. Why do patients with head and neck squamous cell carcinoma experience distant metastases: can they be prevented? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;13:101-4.
30. Lipkin A, Miller RH, Woodson GE. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx and larynx in young adults. *Laryngoscope* 1985;95:790-793.
31. Lefebvre JL, Vankemmel B, Adenis L, Buisset E, Demaille A. Carcinomas of the upper aerodigestive tract before age 40 (excluding children). Apropos of 100 cases. *Ann Otolaryngol Chir Cervicofac*. 1987;104:89-92.
32. Hsu WL, Chen JY, Chien YC, Liu MY, You SL, Hsu MM, Yang CS, Chen CJ. Independent effect of EBV and cigarette smoking on nasopharyngeal carcinoma: a 20-year follow-up study on 9,622 males without family history in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(4):1218-26.
33. Mork J, Lie AK, Glatte 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;344:1125-31.
34. Smith EM, Ritchie JR, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:449-55.
35. Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, et al: Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 1996;93:4350-4354.
36. Sarkaria JN, Harari PM. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. *Head Neck*. 1994;16:107-111.
37. Axon PR, Simo R, Fergie N, Temple RH, Farrington WT. Carcinoma of the hypopharynx and cervical esophagus in young adults. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2000;109:590-593.
38. Annertz K, Anderson H, Biorklund A, Moller T, Kantola S, Mork J, Olsen JH, Wennerberg J. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue

- in Scandinavia, with a special reference to young adults. *Int J Cancer*. 2002;101:95-99.
39. Day TA, Davis BK, Gillespie MB, Joe JK, Kibbey M, Martin-Harris B, Neville B, Richardson MS, Rosenzweig S, Sharma AK, Smith MM, Stewart S, Stuart RK. Oral cancer treatment. *Curr Treat Options Oncol*. 2003;4(1):27-41.
 40. Hino R, Uozaki H, Inoue Y, Shintani Y, Ushiku T, Sakatani T, Takada K, Fukayama M. Survival advantage of EBV-associated gastric carcinoma: survivin up-regulation by viral latent membrane protein 2A. *Cancer Res*. 2008;68(5):1427-35.
 41. Al Moustafa AE, Chen D, Ghabreau L, Akil N. Association between human papillomavirus and Epstein-Barr virus infections in human oral carcinogenesis. *Med Hypotheses*. In press 2009.
 42. Dong SM, Kim HS, Rha SH, Sidransky. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. *Clin Cancer Res*. 2001;7:1982-1986.
 43. Lin TS, Lee H, Chen RA, Ho ML, Lin CY, Chen YH, Tsai YY, Chou MC, Cheng YW. An association of DNMT3b protein expression with P16INK4a promoter hypermethylation in non-smoking female lung cancer with human papillomavirus infection. *Cancer Lett*. 2005;226(1):77-84.
 44. Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol*. 2001;13:183-188.
 45. Raab-Traub N. Pathogenesis of Epstein-Barr virus and its associated malignancies. *Semin Virol*. 1996;7:305-313.
 46. Toruner GA, Ulger C, Alkan M, Galante AT, Rinaggio J, Wilk R, Tian B, Soteropoulos P, Hameed MR, Schwalb MN, Dermody JJ. Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;154(1):27-35.
 47. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*. 2002;3(6):415-28.
 48. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349:2042-54.
 49. Momparler RL. Cancer Epigenetics. *Oncogene*. 2003;22:6479-6483.
 50. Feinberg AP. The epigenetics of cancer etiology. *Semin Cancer Biol*. 2004;14:427-32.
 51. Ducasse M, Brown MA. Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer*. 2006;5:60.

52. Teodoridis JM, Strathdee G, Brown R. Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. *Drug Resist Updat*. 2004;7(4-5):267-78.
53. Goto T, Mizukami H, Shirahata A, Sakata M, Saito M, Ishibashi K, Kigawa G, Nemoto H, Sanada Y, Hibi K. Aberrant methylation of the p16 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2009;29(1):275-7.
54. Vasilatos SN, Broadwater G, Barry WT, Baker JC Jr, Lem S, Dietze EC et al. CpG island tumor suppressor promoter methylation in non-BRCA-associated early mammary carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(3):901-14.
55. Tanemura A, Terando AM, Sim MS, van Hoesel AQ, de Maat MF, Morton DL, Hoon DS. CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(5):1801-7.
56. Vaissière T, Hung RJ, Zaridze D, Moukeria A, Cuenin C, Fasolo V et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. *Cancer Res*. 2009;69(1):243-52.
57. Wang L, Rodriguez M, Kim ES, Xu Y, Bekele N, El-Naggar AK, Hong WK, Mao L, Oh YW. A novel C/T polymorphism in the core promoter of human de novo cytosine DNA methyltransferase 3B6 is associated with prognosis in head and neck cancer. *Int J Oncol*. 2004;25:993-9.
58. Chang KP, Hao SP, Liu CT, Cheng MH, Chang YL, Lee YS, Wang TH, Tsai CN. Promoter polymorphisms of DNMT3B and the risk of head and neck squamous cell carcinoma in Taiwan: a case-control study. *Oral Oncol*. 2007;43:345-51.
59. Liu Z, Wang L, Wang LE, Sturgis EM, Wei Q. Polymorphisms of the DNMT3B gene and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Lett*. 2008;268:158-65.
60. Strati K, Pitot HC, Lambert PF. Identification of biomarkers that distinguish human papillomavirus (HPV)-positive versus HPV-negative head and neck cancers in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:14152-14157.
61. Takes RP, Baatenburg De Jong RJ, Schuurin E, Litvinov SV, Hermans J, Van Krieken JH. Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res*. 1998;18:4793-4800.
62. Willem P, Brown J, Schouten J. A novel approach to simultaneously scan genes at fragile sites. *BMC. Cancer*. 2006;6:205.
63. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol*. 2000;36:311-327.

64. Grønbaek K, Hothar C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS*. 2007;115(10):1039-59.
65. Tuyns AJ, Estève J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F, Boffetta P, Crosignani P, del Moral A, Lehmann W, et al. Cancer of the larynx/hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international case-control study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer*. 1988;41(4):483-91.
66. Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, Sitas F, Smith J, Stayner L, Straif K, Thun MJ, Wichmann HE, Wu AH, Zaridze D, Peto R, Doll R. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(2):99-106.
67. Sancar A. DNA repair in humans. *Annu Rev Genet*. 1995;69-105.
68. Wei Q, Cheng L, Amos CI, Wang LE, Guo Z, Hong WK, Spitz MR. Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study. *J Natl Cancer Inst (Bethesda)*. 2000;92: 1764-1772.
69. Zhou W, Liu G, Miller DP, Thurston SW, Li Lian X, Wain JC, Lynch TJ, Li S, Christiani DC: Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer. *Cancer Res*. 2002, 62:1377-1381.
70. Kowalski M, Przybyłowska K, Rusin P, Olszewski J, Morawiec-Sztandera A, Bielecka-Kowalska A, Pietruszewska W, Mlynarski W, Szemaraj J, Majsterek I. Genetic polymorphisms in DNA base excision repair gene XRCC1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Exp Clin Cancer Res*. 2009;28:37.
71. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*. 2002;21(35):5427-40.
72. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.
73. Weissbach A. A chronicle of DNA methylation (1948-1975). *EXS*. 1993;64:1.
74. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood*. 1999;93(12):4059-4070.
75. Fazzari MJ, Greally JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nature Rev Gen*. 2004;5:446-455.
76. Rush LJ, Plass C. Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies. *Cancer Letters*. 2002;185:1-12.
77. Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J*. 1998;17:4905-4908.

78. French SW, Dawson DW, Miner MD, Doerr JR, Malone CS, Wall R, Teitell MA. DNA methylation profiling: a new tool for evaluating hematologic malignancies. *Clin. Immunol.* 2002;103:217-230.
79. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001;293:1074-1080.
80. Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell.* 1997;88(4):471-81.
81. Eng C, Herman JG, Baylin SB. A bird's eye view of global methylation. *Nat Genet.* 2000;24(2):101-2.
82. Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(2):241-57.
83. Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:2571-2587.
84. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2395-402.
85. Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet.* 2003;33(1):61-5.
86. Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(3):143-54.
87. Hsieh CL. Dynamics of DNA methylation pattern. *Curr Opin Genet Dev.* 2000;10:224-8.
88. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science.* 1999;286(5439):531-7.
89. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 1999;21:163-167.
90. Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Zheng S, Christiani DC, Wain JC, Mark EJ, Kelsey KT. p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2001;61(8):3419-24.
91. Shaw RJ, Hall GL, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Field JK et al. Quantitative methylation analysis of resection margins and lymph nodes in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007;45(8):617-22.

92. Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, Souza FP, Filho JF, Fukuyama EE, Camargo AA, Caballero OL, Tajara EH, Cordeiro JA, Rahal P. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007;173(1):31-7.
93. Auerkari EI. Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2006;42:5-13.
94. Vertino PM, Issa JP, Pereira-Smith OM, Baylin SB. Stabilization of DNA methyltransferase levels and CpG island hypermethylation precede SV40-induced immortalization of human fibroblasts. *Cell Growth Differ.* 1994;5(12):1395-402.
95. Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev.* 2003;2(3):245-61.
96. Xiao Y, Word B, Starlard-Davenport A, Haefele A, Lyn-Cook BD, Hammons G. Age and gender affect DNMT3a and DNMT3b expression in human liver. *Cell Biol Toxicol.* 2008;24(3):265-72.
97. Kim YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:511-9.
98. Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene.* 2002;21(27):4231-6.
99. Ai L, Stephenson KK, Ling W, Zuo C, Mukunyadzi P, Suen JY, Hanna E, Fan CY. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol.* 2003;16(9):944-50.
100. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993;366:704-707.
101. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16(INK4A) gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett.* 2001;163(2):221-8.
102. Garcea G, Neal CP, Pattenden CJ, Steward WP, Berry DP. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review. *Eur J Cancer.* 2005 Oct;41(15):2213-36.
103. Schneider BG, Gulley ML, Eagan P, Bravo JC, Mera R, Geradts J. Loss of p16/CDKN2A tumor suppressor protein in gastric adenocarcinoma is associated with Epstein-Barr virus and anatomic location in the body of the stomach. *Hum Pathol.* 2000;31(1):45-50.

104. Zhang SY, Klein-Szanto AJ, Sauter ER, Shafarenko M, Mitsunaga S, Nobori T, Carson DA, Ridge JA, Goodrow TL. Higher frequency of alterations in the p16/CDKN2 gene in squamous cell carcinoma cell lines than in primary tumors of the head and neck. *Cancer Res.* 1994;54:5050-5053.
105. Geradts J, Kratzke RA, Niehans GA, Lincoln CE. Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INK4A in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression. *Cancer Res.* 1995;55(24):6006-11.
106. Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol.* 1998;34(5):396-403.
107. Sasaki S, Yamamoto H, Kaneto H, Ozeki I, Adachi Y, Takagi H, Matsumoto T, Itoh H, Nagakawa T, Miyakawa H, Muraoka S, Fujinaga A, Suga T, Satoh M, Itoh F, Endo T, Imai K. Differential roles of alterations of p53, p16, and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Oncol Rep.* 2003;10(1):21-5.
108. Herman JG, Baylin SB. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. In: Vogt PA, Ja PK, editors. *DNA methylation and cancer.* 1st ed. New York: Springer-Verlag; 2000. p. 35-50.
109. Rocco JW, Sidransky D. p16 (MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2001; 264: 42-55.
110. Zochbauer-Muller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* 2001;61:249-55.
111. Wang J, Lee JJ, Wang L, et al. Distinct value of p16INK4a and RASSF1A promoter methylation in prognosis of the patients with respectable non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;9:4415-22.
112. Safar AM, Spencer H III, Su X, et al. Methylation profiling of archived non-small cell lung cancer: a promising prognostic system. *Clin Cancer Res.* 2005;11:4400-5.
113. Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2001;37:498-504.
114. Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, Shibata T. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132(11):735-43.
115. Nagai MA. Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Braz J Med Biol Res.* 1999;32(7):897-904.

116. Den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet.* 2001;109:121-124.
117. Miller MC, Mohrenweiser HW, Bell DA. Genetic variability in susceptibility and response to toxicants. *Toxicol Lett.* 2001;120:269-280.
118. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 1980;32:314-331.
119. Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keys KM, Smerick JB, Budowle B. Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci.* 2001;46:647-660.
120. Parkhill JM, Hennig BJ, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000;27:682-689.
121. Brydon L, Edwards S, Jia H, Mohamed-Ali V, Zachary I, Martin, JF, Steptoe A. Psychological stress activates interleukin-1beta gene expression in human mononuclear cells. *Brain Behav Immun.* 2005;19:540-546.
122. Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovine FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson Jr TG, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1997;24:72-77.
123. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:2291-2298.
124. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 2001;97:1172-1179.
125. Patra SK, Patra A, Zhao H, Dahiya R. DNA methyltransferase and demethylase in human prostate cancer. *Mol Carcinog.* 2002;33:163-171.
126. Nagai M, Nakamura A, Makino R, Mitamura K. Expression of DNA (5-cytosin)-methyltransferases (DNMTs) in hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res.* 2003;26:186-191.
127. Montgomery KG, Liu MC, Eccles DM, Campbell IG. The DNMT3B C-->T promoter polymorphism and risk of breast cancer in a British population: a case-control study. *Breast Cancer Res.* 2004;6(4):R390-4.

128. Singal R, Das PM, Manoharan M, Reis IM, Schlesselman JJ. Polymorphisms in the DNA methyltransferase 3b gene and prostate cancer risk. *Oncol Rep.* 2005;14(2):569-73.
129. Wu Y, Lin JS. DNA methyltransferase 3B promoter polymorphism and its susceptibility to primary hepatocellular carcinoma in the Chinese Han nationality population: A case-control study. *World J Gastroenterol.* 2007;13(45):6082-6.
130. Li Y, Dai Y, Wu SL, Pei P, Cao XH, Pu DF. The C46359T polymorphism of DNMT3B promoter gene and pathogenesis of acute leukemia. [Abstract]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2005;44(8):588-91.
131. Jones JS, Amos CI, Pande M, Gu X, Chen J, Campos IM, Wei Q, Rodriguez-Bigas M, Lynch PM, Frazier ML: DNMT3b polymorphism and hereditary nonpolyposis colorectal cancer age of onset. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:886-891.
132. Wang L, Wang J, Sun S, Rodriguez M, Yue P, Jang SJ, Mao L. A novel DNMT3B subfamily, DeltaDNMT3B, is the predominant form of DNMT3B in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2006;29:201-207.
133. Neumann AS, Sturgis EM, Wei Q. Nucleotide excision repair as a marker for susceptibility to tobacco-related cancers: a review of molecular epidemiological studies. *Mol Carcinog.* 2005;42:65-92.
134. Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol.* 2006;59:445-453.
135. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, Ahrendt S, Eby Y, Sewell D, Nawroz H, Bartek J, Sidransky D. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1996;56:3630-3633.
136. Hogg RP, Honorio S, Martinez A, Agathangelou A, Dallol A, Fullwood P, Weichselbaum R, Kuo MJ, Maher ER, Latif F. Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene from region 3p21.3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 2002;38:1585-1592.
137. Yakushiji T, Uzawa K, Shibahara T, Noma H, Tanzawa H. Over-expression of DNA methyltransferases and CDKN2A gene methylation status in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Int J Oncol.* 2003;22:1201-1207.
138. Wang J, Walsh G, Liu DD, Lee JJ, Mao L. Expression of Δ DNMT3B variants and its association with promoter methylation of p16 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2006;66:8361-8366.

139. Simão Tde A, Simões GL, Ribeiro FS, Cidade DA, Andreollo NA, Lopes LR, Macedo JM, Acatauassu R, Teixeira AM, Felzenszwalb I, Pinto LF, Albano RM. Lower expression of p14ARF and p16INK4a correlates with higher DNMT3B expression in human oesophageal squamous cell carcinomas. *Hum Exp Toxicol.* 2006;25(9):515-22.
140. Mckurick VA. Mendelian Inheritance In Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. 11. ed. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press, 1994.
141. Smith ML, Chen IT, Zhan Q, O'connor PM, Fornace Jr AJ. Involvement of the p53 tumor suppressor in repairs of u.v.-type DNA damage. *Oncogene.* 1995;10:1053-59.
142. Whyte DA, Broton CE, Shillitoe EJ. The unexplained survival of cells in oral cancer: What is the role of p53? *J Oral Pathol Med.* 2002;31:125-33.
143. Carter S, Bischof O, Dejean A, Vousden KH. C-terminal modifications regulate MDM2 dissociation and nuclear export of p53. *Nature cell biology.* 2007;9: 428-35.
144. Darnton SJ. Demystified ... p53. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 1998;51:248-53.
145. Voorzanger-Rousselot N, Garnero P. Biochemical markers in oncology. Part I: Molecular basis. Part II: Clinical uses, *Cancer Treat Rev.* 2007;33:230-83.
146. Koch WM, Brennan MZ, Goodman SN, Westra WH, Schwab D, Yoo GH, Lee DJ et al. P53 mutation and locoregional treatment failure in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute.* 1996;88:1580-6.
147. Tan LKS, Ogden GR. p53 over-expression in laryngeal carcinoma is not predictive of response to radiotherapy. *Oral Oncology,* 1997;33:177-81.
148. Hiranuma H, Jikko A, Maeda T, Matumura S, Murakami S, Fukuda Y et al. An analysis of the prognostic significance of p53 status for squamous cell carcinoma of the oral cavity treated by radiotherapy. *Oral Oncology.* 1998;34:513-8.
149. Koelbl O, Rosenwald A, Haberl M, Muller J, Reuther J, Flentje M. p53 and Ki-67 as predictive markers for radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the oral cavity? An immunohistochemical and clinicopathologic study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 49:147-54.
150. Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Panikkar KR, Nair MK, Pillai MR. Apoptosis, angiogenesis and proliferation: trifunctional measure of tumour response to radiotherapy for oral cancer. *Oral Oncology.* 2001;37:164-71.

151. Ganly I, Soutar DS, Brown R, Kaye SB. p53 alterations in recurrent squamous cell cancer of the head and neck refractory to radiotherapy. *Br J Cancer*. 2000;82:392-98.

ANEXOS

ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/UNIMONTES



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
COMITÊ DE ÉTICA

PARECER CONSUBSTANCIADO

Montes Claros, 06 de julho de 2008.

Processo N.º 1085

Título do Projeto: Estudo da associação do polimorfismo DNMT3B (C46359T) com a metilação do gene p16CDKN2 no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em indivíduos jovens e clássicos

Coordenador: Prof. André Luiz Sena Guimarães

Relatora: Profa. Vera Lucia Mendes Trabbold.

Histórico

O Carcinoma Epidermóide é a neoplasia maligna de células epiteliais que mais acomete a cavidade bucal, em diferentes sítios anatômicos. É uma doença multifatorial, sendo sua etiopatogênese relacionada a distúrbios genéticos, moleculares e ambientais. O valor prognóstico de vários marcadores biológicos tumorais em câncer de cabeça e pescoço tem sido pesquisado, destacando-se a investigação de marcadores de proliferação celular, oncoproteínas, proto-oncogenes e genes supressores de tumor. A metilação do DNA é um fenômeno epigenético decorrente da adição do radical metil (CH₃) em regiões específicas do DNA contendo, predominantemente, citosinas. Esse processo desempenha função importante na estabilidade estrutural da cromatina, modulação da expressão gênica e desenvolvimento embrionário. No entanto, o mecanismo da metilação pode estar envolvido tanto na causa como na consequência do processo carcinogênico. O universo do presente estudo consiste no conjunto de 75 espécimes de biópsias excisionais de carcinoma epidermóide de cavidade bucal de pacientes com diferentes estadiamentos clínicos definidos (TNM). Estes serão provenientes de centros cirúrgicos particulares e hospitais da rede pública e privada de Montes Claros - MG. O presente estudo não apresenta nenhum risco aos participantes do estudo uma vez que utiliza material dos arquivos de parafina.

Mérito

Embora haja um grande número de trabalhos científicos sobre o emprego de imunomarcadores em lesões de carcinoma epidermóide de cavidade bucal, pouco se sabe sobre o valor prognóstico de eventos moleculares na doença. Nesse contexto, destaca-se a ocorrência polimorfismos genéticos, alterações epigenéticas, além da expressão imunistoquímica de genes supressores de tumor, como fatores intrinsecamente relacionados à etiopatogênese do carcinoma epidermóide. O presente estudo busca avaliar uma possível associação do polimorfismo DNMT3B (C46359T) com hipermetilação do gene p16CDKN2 e sua expressão imunistoquímica no carcinoma epidermóide de cavidade bucal, relacionando aos fatores clinicopatológicos da doença (tamanho da lesão, metástases regionais, recorrência loco-regional e taxa de sobrevida).

Parecer

O Comitê de Ética da Unimontes analisou o processo 1085, e entende que o mesmo está completo e dentro das normas do Comitê e das Resoluções do Conselho Nacional da Saúde/Ministério da Saúde. Sendo assim, somos pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa.

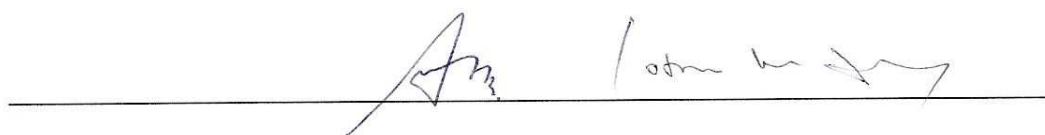
Prof. Vânia Silva Vilas Boas Vieira Lopes
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da Unimontes

ANEXO II**Termo de Autorização - Instituto de Patologia do Norte de Minas - Montes Claros/MG****Declaração**

Em virtude da fundamental importância da realização de pesquisas relacionadas ao câncer de cabeça e pescoço, o Instituto de Patologia do Norte de Minas - Montes Claros/MG estabeleceu uma parceria com o Laboratório de Pesquisa em Saúde da Universidade Estadual de Montes Claros/MG cedendo, à título de empréstimo, amostras de biópsias de lesões de Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, em blocos de parafina, para fins de pesquisas, regidas por critérios éticos e legais.

Dessa forma, declaro para devidos fins de pesquisa, que este instituto autoriza a coleta de materiais dessa natureza para realização de projetos de pesquisa sob coordenação, em especial, do Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula e Dr. André Luiz Sena Guimarães.

Montes Claros, 01 de Setembro de 2008.



José Quaresma da Costa Neto e Edson da Silva Gusmão

Instituto Norte Mineiro de Patologia - Montes Claros/Minas Gerais

APÊNDICE

APÊNDICE I

Desenho dos *primers* DNMT3B

A sequência de nucleotídeos correspondente ao *primer* DNMT3B R foi baseado em Shen et al., 2002. A sequência DNMT3B F foi desenhada com base na sequência de nucleotídeos disponível no Banco de Genes do Centro Nacional para Informação em Biotecnologia (NCBI), utilizando o software “Annhyb” (<http://annhyb.free.fr>) e Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Esta última análise confirmou a especificidade da sequência de oligonucleotídeos desenhada.

PCR product from polimorfism (February 18, 2009 20:10)

Rev

found oligo score: 100

sense: -

position: 361 - 380

query: CCGTGGAGTTCCCGGCTACC

|||||

target: CCGTGGAGTTCCCGGCTACC

Oligo1

found oligo score: 100

sense: +

position: 151 - 172

query: TGGCTACCAGGTCTCCTTGGCC

|||||

target: TGGCTACCAGGTCTCCTTGGCC

PCR product:

Length: 230 bp

GC%: 62.61

Tm (50 mM Na+): 83.4 °C

BlnI Restriction Enzyme - C/T

PCR Product 230bp

Restriction 172 +58

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](#)