

Denise Nahas Martin Gaspar

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS - 238 E -308
DO GENE *TNF- α* EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA E
OROFARINGE**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação do Hospital Heliópolis – HOSPHEL- como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

SÃO PAULO

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Denise Nahas Martin Gaspar

**AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS - 238 E -308
DO GENE *TNF- α* EM PACIENTES COM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA E
OROFARINGE**

Tese de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação do Hospital Heliópolis –HOSPHEL– como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientação: Prof. Dr Marcos Brasilino de Carvalho
Co-Orientação: Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva

SÃO PAULO

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Gaspar, Denise Nahas Martin

Avaliação dos polimorfismos -238 e -308 do gene *TNF- α* em pacientes com carcinoma epidemóide de boca e orofaringe / Denise Nahas Martin Gaspar; Orientador: Marcos Brasilino de Carvalho-São Paulo, 2009 Xi, 56f.: il., fig. e tab.

Dissertação (mestrado) – Hospital Heliópolis.
Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Título em inglês: Avaliation of -238 and -308 *TNF- α* gene polymorphisms in patients with mouth and oropharynx squamous cell carcinoma.

Inclui bibliografia e apêndices.

1.Carcinoma 2.Câncer 3. *TNF- α*

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha maravilhosa família que é o alicerce de tudo o que sou...

Aos meus queridos pais Idir e Rose que sempre me apoiaram e
incentivaram,

Às minhas irmãs Cristina e Luciana pela imensa amizade e
cumplicidade durante toda a vida,

Aos meus tios Linda, Sônia e Ricardo que contribuíram muito para a
minha formação pessoal,

E ao meu querido tio Marcos, o Dr. Brasilino, que sempre foi para mim
uma referência como pessoa, minha admiração por ele só aumentou
com o convívio profissional.

Agradecimento

Ao Prof. Dr. Marcos Brasilino de Carvalho, meu orientador , pelo seu exemplo e principalmente por sua amizade.

À Profa Dra. Adriana Madeira por transmitir um pouco de sua paixão pela biologia.

À Rossana Mendonza Lopez, da Epidemiologia da USP, pela ajuda na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Abrão Rapoport, Coordenador do curso de Pós-Graduação do Hospital Heliópolis, pela oportunidade de crescimento acadêmico.

Ao corpo docente e funcionários do Curso de Pós-Graduação, pelos ensinamentos, amizade e dedicação.

Aos companheiros de laboratório Jean Tetsuo Takamori, Marcelo Santos, Jáfia Lacerda Alves, Liliane Rossi e Diana Gazito por tornarem as horas no laboratório muito mais divertidas.

Ao amigo Paulo Ricardo Salotti que ajudou a mostrar que os dentistas também podem entender de Biologia Molecular.

SUMÁRIO

	pag
	.
Dedicatória	i
.....	
Agradecimentos	ii
.....	
Sumário.....	iii
....	
Lista de Tabelas.....	iv
Lista de Quadros.....	v
.....	
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Abreviaturas.....	vii
Resumo.....	viii
....	
Abstract.....	ix
....	
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	08
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
3.1. A citocina TNF- α	11
3.2. Os polimorfismos no gene TNF e o câncer.....	12
3.3. O gene TNF- α e o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	14
3.4. Os polimorfismos do gene TNF- α e o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	16
4. LOCAL DE ESTUDO CASUÍSTICA.....	E 18
5. MATERIAL MÉTODOS.....	E 22
5.1. Extração de DNA Sangue.....	- 23
5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	25
5.3. Digestão com enzimas de restrição.....	28
5.4. Forma de análise dos resultados do estudo dos	28

polimorfismos.....		
5.5. estatístico.....	Método	31
5.6. éticos.....	Aspectos	32
6. RESULTADOS.....		34
6.1. Estudo de caso-controle: fatores relacionados com carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.....		35
6.1.1. Variáveis em estudo.....		34
6.1.2. Regressão logística.....	Regressão	35
6.2. Fatores prognósticos.....	Fatores	38
6.2.1. Variáveis em estudo.....		38
6.2.2. Análise de sobrevida.....		39
6.3. Análise dos polimorfismos em conjunto.....		50
6.3.1. Associação entre os polimorfismos genéticos e as variáveis clínicas e histopatológicas.....		50
6.3.2. Análise de sobrevida.....		53
7. DISCUSSÃO.....		61
8. CONCLUSÕES.....		69
9. BIBLIOGRÁFICAS.....	REFERÊNCIAS	71

LISTA DE TABELAS

	pag
	.
Tabela 1. Características sócio demográficas dos participantes, de acordo com o grupo de estudo.....	20
Tabela 2. Primers utilizados nas reações de PCR para as regiões promotoras do gene TNF- α , tamanho dos fragmentos gerados pela reação e temperatura de anelamento das reações.....	26
Tabela 3. Frequência genotípica do TNF-308 e TNF-238 dos indivíduos participantes do estudo.....	35
Tabela 4. Análise dos polimorfismos -308 e -238 como fatores de risco	36

para a doença.....	36
Tabela 5. Análise das variáveis epidemiológicas como fatores de risco da doença.....	36
.....	
Tabela 6. Distribuição das razões de risco de apresentar a doença.....	37
.....	
Tabela 7. Distribuição das frequências alélicas do TNF-308 e TNF-238 segundo a condição da última avaliação.....	39
Tabela 8. Análise da probabilidade de sobrevida específica e global.....	42
Tabela 9. Distribuição das razões de risco para a análise de sobrevida específica.....	43
..	
Tabela 10. Distribuição das razões de risco para as variáveis histopatológicas.....	45
Tabela 11. Distribuição das razões de risco ajustada para a análise de sobrevida.....	49
..	
Tabela 12. Características clínicas dos grupos de maior risco e de menor risco.....	51
...	
Tabela 13. Análise comparativa das características histológicas do tumor.....	52
.....	
Tabela 14. Análise da sobrevida dos pacientes estudados.....	53
Tabela 15. Análise da probabilidade de sobrevida específica e global.....	56
Tabela 16. Distribuição das razões de chance para a análise de sobrevida nos dois grupos estudados.....	57
Tabela 17. Distribuição das razões de chance ajustada para a análise de sobrevida nos grupos de maior e menor risco.....	60

LISTA DE QUADROS

	pag
	.
Quadro 1. Lista de reagentes utilizados para o preparo da solução tampão 1.....	24
....	
Quadro 2. Lista de reagentes utilizados para o preparo da solução tampão 2.....	24
...	
Quadro 3. Lista de reagentes utilizados para o preparo da solução de TE (tris-EDTA).....	24
Quadro 4. <i>Primers</i> para as reações de PCR da região promotora do gene <i>TNF-α</i> mostrando o <i>primer forward</i> com a base modificada - c sublinhada (mudança de g para c no <i>primer</i>). O <i>primer reverse</i> contém a base c sublinhada (mudança de g para c).....	27

LISTA DE FIGURAS

	pag
	.
Figura 1. Figura do cromossomo 6 mostrando a localização do gene TNF- α . Fonte : http://ncbi.nih.gov	5
Figura 2. Fotografia de gel de agarose 2% corado com brometo de etídio com a amplificação do fragmento de 116pb do gene TNF- α . As colunas 2 a 6 referem-se aos produtos amplificados e a coluna 1 refere-se ao marcador de peso molecular de 100 pares de base.....	26
Figura 3. Sítio de reconhecimento da endonuclease de restrição NcoI, com a substituição de uma guanina por uma adenina.....	29
Figura 4. Fotografia de gel de agarose 3% corado com brometo de etídio onde visualizamos os resultados da reação de digestão com os fragmentos do gene TNF- α na posição -308. As colunas 2 a 8 referem-se aos produtos amplificados e a coluna 1 refere-se ao marcador de peso molecular de 100 pares de base.....	29
Figura 5. Sítio de reconhecimento da endonuclease de restrição Avall, com a substituição de uma guanina por uma adenina.....	30
Figura 6. Fotografia do gel de agarose 3% corado com brometo de etídio com os fragmentos de digestão do gene TNF- α para o polimorfismo -238. As colunas 2, 3 e 4 apresentam indivíduos sem polimorfismos, as colunas 5 a 8 apresentam indivíduos heterozigotos. Na coluna 1 está o marcador de peso molecular de 100 pares de base.....	30
Figura 7. Curva de sobrevida global.....	41
Figura 8. Curva de sobrevida específica pela doença.....	42
Figura 9. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para TNF -308.....	46
Figura 10. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para TNF -238.....	48
Figura 11. Curva de sobrevida global dos grupos de polimorfismos agrupados.....	54
....	
Figura 12. Curva de sobrevida específica pela doença dos grupos de polimorfismos agrupados.....	55
.....	
Figura 13. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos grupos de polimorfismos agrupados.....	59
..	

LISTA DE ABREVIATURAS

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral- α

CECP: Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

TRADD: Componente do receptor TNFR– 1

MHC: *Major histocompatibility complex* (complexo de histocompatibilidade maior)

DPOC: Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

NF- κ B: Fator nuclear- κ B (Regulador de transcrição)

MMP-9: Matriz - metaloproteinase 9

TNFR-1: Receptor da proteína TNF- α 1

TNFR-2: Receptor da proteína TNF- α 2

RESUMO

Introdução: O gene TNF- α , parte da grande família TNF, faz parte da cascata da inflamação e participa de uma das vias da apoptose. Ele tem importante papel na patologia de diversas doenças, inclusive o carcinoma epidermóide de boca e orofaringe. **Objetivo:** Correlacionar os polimorfismos -308 e -238 do gene TNF- α com o fator de risco ao carcinoma epidermóide de boca e orofaringe e analisar o papel desses polimorfismos na sobrevida desses pacientes. **Método:** 188 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca e orofaringe foram comparados com 235 controles, avaliados por PCR para identificação dos polimorfismos TNF-238 e TNF-308. Foram realizadas curvas de sobrevida dos pacientes para análise da sobrevida global e específica da doença. Também realizamos a análise dos polimorfismos em conjunto levando em consideração o grupo de menor risco (n= 15) e maior risco (n=42) para o carcinoma epidermóide de boca e orofaringe, para esses grupos também foram realizados testes de risco e sobrevida. **Resultados:** Não houve diferença estatística em relação ao risco da doença quanto a presença dos polimorfismos -238 e -308 do gene TNF- α . Não houve diferença estatística quando consideramos o tempo de sobrevida dos pacientes entre os indivíduos com polimorfismos do gene TNF- α nas regiões -238 e -308. **Conclusão:** A partir da análise dos resultados observados podemos concluir que: os polimorfismos TNF-238 e TNF-308 não estão relacionados ao risco de desenvolver carcinoma epidermóide de boca e orofaringe e esses polimorfismos também não estão relacionados com o tempo de sobrevida desses pacientes.

Descritores: Carcinoma, Câncer, TNF- α

ABSTRACT

Introduction: The TNF- α gene, part of the major TNF family, is part of the inflammation and participates in one of the apoptosis pathways. It has an important role in the pathology of several diseases, including squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx. **Objective:** To correlate the polymorphisms -308 and -238 of TNF- α gene with the risk factors for mouth and oropharynx squamous cell carcinoma and analyze the role of these polymorphisms on the survival of these patients. **Method:** 188 patients with mouth and oropharynx squamous cell carcinoma were compared with 235 controls, assessed by PCR for identification of TNF-238 and TNF-308 polymorphisms. We performed survival curves of patients for analysis of overall and disease related survival. We also carry out the analysis of polymorphisms together taking into account the lower risk group (n = 15) and higher risk (n = 42) for mouth and oropharynx squamous cell carcinoma for these groups were also conducted tests of risk and survival. **Results:** There was no statistical difference in the risk of disease in relation to the presence of TNF- α gene -238 and -308 polymorphisms. There was no statistical difference when considering the survival of patients between those with gene TNF- α -238 and -308 polymorphisms. **Conclusion:** Through the observed results analysis we can conclude that the TNF-238 and TNF-308 polymorphisms are not related to the risk of developing mouth and oropharynx squamous cell carcinoma and these polymorphisms are not related to survival of these patients.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A relação entre inflamação e câncer foi sugerida pela primeira vez em 1863, quando o médico alemão Rudolph Virchow, observou a presença de leucócitos em tecido neoplásico. Ele sugeriu que o infiltrado linforeticular refletia a origem do câncer nos locais de inflamação crônica (Balkwill e Mantovani, 2001). Desde então, uma grande quantidade de publicações tem corroborado a evidência da oncogênese mediada pela inflamação (Macarthur e El-Omar, 2006).

Ao encontro desta teoria está o fato de que várias condições inflamatórias são consideradas como co-fatores na carcinogênese. Uma série de neoplasias malignas é associada a agentes infecciosos e à inflamação; o câncer de bexiga com a schistosomia, o carcinoma de cervix e de orofaringe ao papilomavirus, a microbiota bucal e o câncer de boca, a gastrite induzida pelo *H. pylori* e o câncer gástrico, o câncer colorretal e a retocolite, a hepatite B e C e o hepatocarcinoma são alguns dos exemplos mais comuns. Tem sido sugerido que as células inflamatórias e as citocinas encontradas nos tumores podem contribuir para o crescimento tumoral, progressão e imunossupressão (Balkwill e Mantovani, 2001).

Um dos fatores inflamatórios que vem sendo relacionado aos tumores é o TNF- α , uma citocina multifuncional produzida principalmente por monócitos, que é expressa em uma grande variedade de tumores e cuja presença é geralmente associada ao mau prognóstico (Balkwill, 2002) (Shirai *et al.*, 1985). A proteína TNF- α foi inicialmente reconhecida por sua citotoxicidade e sua atividade antitumoral, e hoje sabemos que ela possui um largo espectro de atividades biológicas, desde efeitos regulatórios até efeitos inibitórios em parasitas e vírus, além de um papel chave nos complexos eventos envolvidos na inflamação e na imunidade (Jacob *et al.*, 1990; Nedwin *et al.*, 1985; Skoog *et al.*, 1999; Jang *et al.*, 2001).

O aumento sérico dos níveis de TNF- α foi associado a diversas doenças, inclusive o câncer (Jang *et al.*, 2001), e os níveis de sua expressão

podem ser determinantes, tanto na sua patogênese quanto na progressão do tumor (Jang *et al.*, 2001).

Soylu *et al.* realizaram um estudo comparativo com pacientes com câncer de cabeça e pescoço e grupo controle para determinar o nível de TNF- α no sangue, antes e depois do tratamento, e observaram que os níveis de TNF- α eram mais elevados naqueles com câncer e que havia um decréscimo significativo nesse nível após o tratamento. Segundo os autores, estes resultados podem fazer o TNF- α um importante marcador tumoral no diagnóstico destes tumores. Entretanto, não foram encontradas correlações entre os níveis de TNF- α e o estágio ou diferenciação do tumor, e os resultados não permitiram determinar se esse aumento era uma resposta do hospedeiro ao tumor ou ele fazia parte do processo de tumorigênese (Soylu *et al.*, 1994).

Na literatura, o papel atribuído ao TNF na evolução e tratamento de doenças malignas tem sido paradoxal. Altas doses em administração local destroem seletivamente vasos sanguíneos do tumor e têm poderosa ação antitumoral (Liu, 2005) (Falkensammer *et al.*, 2006). Porém, quando é produzida cronicamente, a citocina pode agir como um promotor tumoral endógeno, contribuindo para o desenvolvimento estromal necessário para o crescimento do tumor e a sua disseminação (Balkwill, 2002; Suganuma, 1999). Esses efeitos são análogos às funções do TNF- α durante o processo inflamatório, pois enquanto induz a morte de células doentes no sítio da inflamação, ele estimula o crescimento de fibroblastos, destrói vasos, mas também induz vários fatores angiogênicos (Balkwill, 2002).

O TNF- α pode promover a angiogênese diretamente por estimulação da proliferação celular endotelial e indiretamente por modular a expressão de outros fatores pró-angiogênicos (Leek *et al.*, 1998). Além disso, ele pode induzir a expressão das moléculas de adesão e estimular a produção de colagenase que estão envolvidas na maior motilidade e no comportamento invasivo/metastático das células tumorais (Ioculano *et al.*, 1995; Parks *et al.*, 1994; Hohberger *et al.*; 2008).

Além de atuar na cascata do processo inflamatório, o TNF- α também está envolvido na cascata da morte celular por apoptose. A expressão do gene está relacionada à indução da apoptose de células alvo de adenocarcinomas e

linhagens celulares de fibroblastos, mediação da resposta inflamatória e na promoção de moléculas de adesão (Balkwill, 2002).

Briskin *et al.* estudando linhagens celulares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), observaram a indução da apoptose via TNF- α em algumas células de CECP, na concentração de 10^4 U/mL ou acima, mas com diferentes graus de sensibilidade a ele. Eles mostraram as primeiras evidências da capacidade citotóxica dessa citocina e observaram que a sensibilização pelo TNF- α resultava em reações citotóxicas variáveis em linhagens celulares de CECP, com significativa morte celular precedente à fragmentação do DNA (Briskin *et al.*, 1996). Esses resultados foram obtidos também por Sandra *et al.*, que mostraram que o TNF- α induz à apoptose ligando-se ao receptor TNFR1, e esse receptor interage com os domínios de morte da célula recrutando a via TRADD de morte celular. (Sandra *et al.*, 2002)

Kassouf *et al.* (2007) demonstraram que as células tumorais de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço podem desenvolver a habilidade de expressar citocinas de indução de apoptose como FAS, TNF- α e TRAIL, e com isso induzir a apoptose nas células T do sistema imune que teriam como função fazer com que as células tumorais entrassem em apoptose. Esse estado de privilégio imunológico é descrito como “contra-ataque” tumoral.

A expressão e o nível citoplasmático da proteína TNF- α são regulados pela região promotora do gene TNF- α , e os polimorfismos nessa região podem aumentar ou diminuir a concentração plasmática dessa proteína (Jang *et al.*, 2001).

O gene TNF- α está localizado no braço curto do cromossomo 6, na posição 6p21.3, região mais polimórfica e com maior densidade genética de todo o genoma, e pertence à classe II do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) (Figura 1). (Nedwin *et al.*, 1985; Jacob *et al.*, 1990; Cavaleiro e Fonseca, 2004).

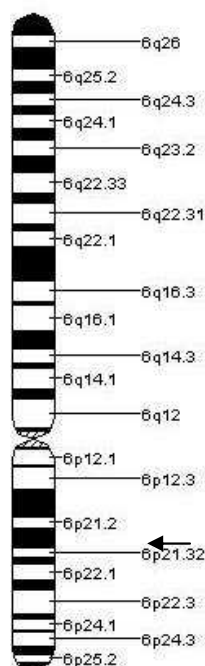


Figura 1. Figura do cromossomo 6 mostrando a localização do gene *TNF- α* .
 Fonte: <http://ncbi.nih.gov>

A região gênica do *TNF- α* é altamente variável. Em sua maioria os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) localizam-se na região promotora do *TNF- α* , nas posições -1031T>C, -863C>A, -857C>A, -851C>T, -419G>C, -376G>A, -308G>A, -238G>A, -162G>A e -49G>A (Cavaleiro e Fonseca, 2004). Os polimorfismos nesse gene envolvem o sítio de ligação do fator de transcrição, afetando as proteínas de ligação nos sítios -323 e -285, resultando em um composto transcricional alterado. A regulação da transcrição do gene *TNF* é essencial para evitar os efeitos deletérios da síntese excessiva do *TNF*. As variações genéticas podem afetar a transcrição e expressão de *TNF* e dentre os vários polimorfismos, os mais estudados são os SNPs na região promotora do *TNF- α* (acesso: <AY274902>) nas posições -238 e -308, ambos envolvendo a substituição de uma guanina por adenina (Wilson *et al.*, 1997; Louis *et al.*, 1998; Abraham e Kroeger, 1999; Azmy *et al.*, 2004; Cavaleiro e Fonseca, 2004).

A presença da SNP -308 está associada ao aumento da transcrição do gene *TNF- α* , enquanto que a SNP na posição -238 associa-se com a diminuição de sua expressão (Ozen *et al.*, 2002; Wilson *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*; 2004).

A significância funcional do produto do polimorfismo ainda não é clara (Wilson *et al.*, 1997; Ozen *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2005) à suscetibilidade a diferentes doenças como diabetes, formas mais graves de artrite reumatóide, bronquite crônica, infecções mais severas em doenças como malária e leishmaniose, entre outras (Mcguire *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2003; Cavaleiro e Fonseca, 2004). Por outro lado, também está relacionada à proteção de algumas formas de doença pulmonar como DPOC e fibrose pulmonar (Oliveira *et al.*, 2004).

Os polimorfismos da região promotora -308 do gene TNF- α têm sido relacionados à susceptibilidade de diversos tipos de neoplasias como o câncer gástrico, mieloma múltiplo, câncer ósseo, câncer de mama, câncer de colo do útero, colorretal e carcinoma de células renais (Chouchane *et al.* 1997; Fei *et al.*, 2004; Macarthur *et al.*, 2004; Neber *et al.*, 2005; Patinõ-Garcia, 2000; Kamali-Saverstan *et al.*; 2004; Jang *et al.*, 2001).

Os estudos realizados com o alelo -238 sugeriram uma função protetora contra o câncer, e esse efeito protetor é creditado à diminuição da produção de TNF- α encontrada nesse polimorfismo, o que pode suportar a proposta de que o TNF- α é um promotor tumoral endógeno (Jang *et al.*, 2001; Cavaleiro e Fonseca, 2004; Oliveira *et al.*, 2004).

Por outro lado, o papel destes polimorfismos como fator de risco para o desenvolvimento dos tumores de cabeça e pescoço de uma maneira geral e, especificamente, do carcinoma epidermóide de boca, não tem encontrado relato uniforme na literatura. Liu *et al.* (2005) após a genotipagem de 192 pacientes com câncer de cavidade oral e 146 controles, constatou que o alelo -308 G era maior entre os pacientes com câncer e o genótipo -238 G/A era menor nestes casos. Gupta *et al.* (2008) estudaram 94 pacientes tabagistas com câncer de boca e 130 controles sadios, e observaram que a frequência do alelo TNF- α - 308G era significativamente menor e do alelo TNF- α - 308A era significativamente mais alta entre os pacientes com câncer do que entre os controles. Não observaram variação entre os casos e os controles quanto ao TNF- α - 238.

Do mesmo modo, não é consensual na literatura a influência que os polimorfismos do TNF- α causam no comportamento biológico e clínico-patológico nos tumores de cabeça e pescoço.

Parks *et al.* (1994) relataram que uma maior produção de TNF- α pode interferir nas características dos tumores de cabeça e pescoço pela sua capacidade de ativar a angiogênese, causando um maior aporte de nutrientes para o tumor, e também pela sua capacidade de afetar as funções dos fibroblastos, estimulando a produção de colagenase o que pode aumentar a capacidade de invasão metastática do tumor. Entretanto, não existem estudos que comprovem esta correlação, seja pelo predomínio de lesões mais avançadas neste grupo de pacientes, ou pela frequência de metástases regionais ou a distância. Romero-Reyes *et al.* (2007) sugerem que estratégias para neutralizar a ação do TNF- α podem ser benéficas para o tratamento do câncer oral, porque um pior prognóstico, assim como resistência a terapia, estão entre as características de tumores que induzem uma maior expressão de TNF- α . Outros estudos mostram diferenças no prognóstico e susceptibilidade também em relação ao câncer de vários sítios de cabeça e pescoço (Parks et al, 1994; Liu et al, 2005), o que justifica o estudo da correlação desses polimorfismos com as características clínicas e histopatológicas do carcinoma epidermóide de boca e orofaringe, para comprovar o seu impacto na susceptibilidade, prognóstico e sobrevida desses pacientes.

O presente estudo pretende avaliar os polimorfismos do gene TNF - α - 308 e -238 nos pacientes com carcinoma epidermóide de boca e orofaringe, como um fator de risco e também como um fator relacionado ao comportamento tumoral e, assim correlacionando-se à sobrevida.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- Estudar os polimorfismos -238 e -308 do gene TNF- α como fator de risco ao carcinoma de boca e orofaringe.
- Estudar a correlação entre os polimorfismos -238 e -308 do gene TNF- α e a sobrevida ao carcinoma epidermóide de boca e orofaringe

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A citocina TNF- α

A citocina TNF- α é um polipeptídeo de 17 kDa, mediadora da inflamação, que de uma forma trimérica liga-se a dois receptores de superfície (TNFR1 e TNFR2) e que age diretamente na destruição e na recuperação do dano (Balkwill, 2002). A produção de TNF estimula mudanças celulares drásticas e remodelação tissular. A sua indução por estímulos patológicos conduz a uma cascata de outras citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e fatores de adesão endoteliais, que recrutam e ativam um grande número de células.

Em 1984, quando o gene TNF foi clonado, surgiu uma grande esperança no seu uso terapêutico no câncer avançado, porque altas doses em administração local destroem seletivamente os vasos tumorais e tem poderosa ação anti-câncer (Liu, 2005). Entretanto, quando ele é produzido cronicamente, pode agir como um promotor tumoral endógeno, contribuindo para a remodelação do tecido, necessária para o tumor crescer e se espalhar. Esses efeitos são análogos aos efeitos do TNF na inflamação, pois enquanto ele induz a morte de células doentes no local da inflamação, estimula o crescimento de fibroblastos, destrói os vasos sanguíneos, também induz vários fatores angiogênicos. A produção crônica de TNF e outras citocinas pelo tumor pode ser uma explicação para a ligação entre condições inflamatórias crônicas e o aumento da suscetibilidade ao câncer (Leek *et al.*, 1998; Balkwill, 2002).

Abraham e Kroeger (1999), em um trabalho de revisão, descreveram o impacto do polimorfismo -308 do gene TNF- α na regulação da atividade transcricional. A mudança da base nitrogenada guanina (alelo TNF1) para adenina (alelo TNF2) na posição -308 do gene TNF é associada com níveis séricos elevados de TNF e maior suscetibilidade a várias doenças. O alelo

TNF2 está associado a uma alteração na ligação da proteína de restrição. O nível elevado de TNF, devido ao polimorfismo -308 pode alterar a resposta imune do paciente.

3.2. Os polimorfismos no gene TNF e o câncer

Suganuma *et al.* (1999) demonstraram que a citocina TNF- α tem um papel essencial na carcinogênese. Em seu artigo eles relataram que ratos com “*Knock-out*” para os dois alelos do gene TNF- α (TNF- α -/-), isto é, com os dois alelos inativados, onde foi usado carcinógeno químico (ácido acadaico) para estimular o desenvolvimento de carcinoma epidermóide em pele, apenas 10% desenvolveram um pequeno tumor, enquanto que 100% dos ratos TNF- α +/+ desenvolveram carcinoma de pele. O estudo sugere que a citocina TNF- α age na promoção do tumor como estimulante para a transformação de células, ativando vários fatores de transcrição e que a IL-1, induzida pelo TNF- α , estará envolvida na progressão do tumor.

Jang *et al.* (2001) estudaram a associação do polimorfismo na região promotora -238 e -308 do gene TNF- α e a susceptibilidade ao câncer. Foram analisados os polimorfismos -238 e -308 em 169 pacientes com diferentes tipos de câncer (carcinoma cervical uterino, carcinoma colorretal e carcinoma de células renais) e comparados com 92 controles. Não houve diferença estatística em relação ao polimorfismo -308, mas houve no grupo do polimorfismo -238 onde o genótipo TNF-238A foi menor no grupo de pacientes com câncer. Os autores sugerem que esse genótipo pode ter um efeito protetor contra o câncer pela diminuição na produção de TNF- α , o que suporta a proposta de que essa citocina é um promotor tumoral endógeno.

Azmi *et al.* estudaram os polimorfismos -238 e -308 do gene TNF- α e seu papel com a susceptibilidade e severidade ao câncer de mama. Foram genotipados 709 pacientes e 498 controles pareados por sexo e idade. As frequências alélicas dos dois polimorfismos foram similares entre os casos e controles, contudo o polimorfismo - 308 foi associado com invasão

vascular. Os autores concluíram que não houve associação entre os polimorfismos -238 e -308 do gene TNF- α e o risco de câncer de mama na população do Norte da Europa.

Kamali-Sarvestani *et al* (2005) investigaram a associação dos polimorfismos -308 do gene TNF- α e +252 do gene TNF- β e sua associação com a expressão de receptores de estrógeno. O efeito do TNF- α em diminuir os receptores de estrógeno e bloquear o efeito proliferativo das células do câncer de mama já foi comprovado. Foram estudadas 160 pacientes com câncer de mama que foram genotipadas para os dois polimorfismos e a análise imunohistoquímica foi realizada nos tumores. A análise dos polimorfismos separadamente não foi significativa, mas o conjunto dos dois polimorfismos mostrou um aumento significativo nos receptores encontrados. Como conclusão, os autores relatam que esses polimorfismos podem estar associados ao nível de receptores esteróides no câncer de mama.

Gorouhi *et al.*(2008) realizaram uma meta-análise da associação do risco de câncer gástrico com os polimorfismos do gene TNF- α . Foram usados 24 estudos que analisaram os polimorfismos mais estudados: -308 G/A (23 estudos), -238 G/A (9 estudos), -857 C/T (5 estudos). Nessa análise eles concluíram que o genótipo -308 AA foi estatisticamente associado com o risco de câncer gástrico, enquanto os outros polimorfismos não o foram.

Yang *et al.* (2009) estudaram os efeitos das variações genéticas do gene TNF no desenvolvimento de câncer gástrico e seus efeitos conjuntamente com o tabagismo na população coreana. Foram genotipados 84 pacientes e 336 controles pareados para os polimorfismos -238, -308, -857, -863, -1031 do gene TNF- α e 252 do gene TNF- β . O trabalho mostrou que o polimorfismo -857 C/T do gene TNF- α foi associado significativamente ao risco de câncer gástrico, e todos os haplótipos contendo TCT ou CCC dos polimorfismos -1031 T/C, -863 C/A e -857 C/T foram associados com alto risco para câncer gástrico somente entre tabagistas.

A conclusão dos autores foi que o polimorfismo do gene TNF- α -857 pode ter um papel na carcinogênese e risco do câncer gástrico, mas nada foi encontrado entre os outros polimorfismos.

3.3. O gene TNF- α e o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

Soylu *et al.* (1994) avaliaram pelo método imunoradiométrico o nível sérico do TNF- α em pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, para determinar o papel do TNF- α no diagnóstico diferencial de doenças benignas e malignas e no seguimento desses pacientes. Os autores também procuraram correlacionar nível de TNF- α com o estágio e o grau de diferenciação do tumor. Observaram que antes do tratamento, o valor do TNF- α era quase 100 vezes maior no grupo de estudo do que no grupo controle, e esse nível reduzia-se depois do tratamento. Concluíram que o nível sérico de TNF- α pode ser um eficiente marcador tumoral no diagnóstico do CECP.

Su *et al.* (2004) estudaram a expressão de TNF- α e de seus receptores em pacientes mascaradores de betel com carcinoma epidermóide de boca para analisar se esses parâmetros eram associados com a progressão da doença de acordo com o estágio do tratamento. Foi utilizado sangue periférico de 116 pacientes com carcinoma epidermóide em diferentes estágios de tratamento e 19 mascaradores de betel com mucosa normal cujos estágios de tratamento eram: 1) sem tratamento, pacientes com câncer primário ativo sem nenhum tratamento para a doença 2) pacientes que foram tratados por menos de 1 ano com radioterapia, quimioterapia e/ou cirurgia e sem recidiva 3) pacientes que foram tratados e sem recidiva 4) pacientes que foram tratados duas ou mais vezes e com recidiva. Foi utilizado o teste de ELISA para detectar o nível de TNF- α e seus receptores. Eles acharam uma expressão de TNF- α e seus receptores significativamente maiores entre os pacientes com câncer do que entre os controles. Os resultados sugerem que a razão TNF- α / sTNFR2 no sangue pode ser uma ferramenta útil para o diagnóstico precoce de carcinoma epidermóide em pacientes de alto risco.

Hoffmann *et al.* (2007) analisaram a expressão aberrante de citocinas no carcinoma epidermóide e no carcinoma adenóide cístico de cabeça e pescoço. Os autores avaliaram o nível sérico de 10 citocinas, entre elas o

TNF- α . Foi encontrado um nível alterado da expressão nos pacientes com carcinoma epidermóide comparados com os indivíduos controles com predominância de citocinas pró-inflamatórias.

Romero-Reyes *et al.* (2007) investigaram a significância da proteína TNF- α na morte ou perda de função das células do baço e *natural killers* em culturas com tumores de boca. Eles usaram linhagens de tumores em ratos TNF- α +/+ e TNF- α -/-. Os autores concluem que os resultados encontrados sugerem que a grande produção de TNF- α , durante a interação entre o sistema imune com o tumor de boca, é um importante fator de decréscimo na função e sobrevivência das células que fazem parte desse sistema, o que causará um pior prognóstico e até resistência a terapia em tumores que possuem uma maior expressão dessas citocinas.

Kassouf e Thornhill (2008) investigaram se linhagens celulares de carcinoma epidermóide de boca poderiam usar os ligantes Fas-L, TRAIL e TNF- α para induzir a apoptose em linfócitos T como um mecanismo de escapar da resposta imune do hospedeiro. Eles usaram anticorpos contra esses ligantes e demonstraram que o TNF- α pode ser um indutor alternativo de apoptose nos linfócitos, fazendo parte do “contra - ataque” tumoral que confere uma grande vantagem ao tumor, não só por matar as células que tem como função matar o tumor, como gerar também uma tolerância imunológica ao mesmo.

Hohberger *et al.* (2008) pesquisaram se o TNF- α estimula a produção de matriz metaloproteinase - 9 (MMP-9) na carcinogênese de carcinoma oral. Essa enzima é essencial para o processo de invasão tumoral, pois ela irá contribuir para a digestão da lâmina basal. Eles demonstraram que com o aumento da quantidade de TNF- α no ambiente tumoral há um aumento proporcional de NF- κ B, que é um conhecido indutor de matriz metaloproteinase, com isso, após o estímulo do TNF- α , a secreção de MMP-9 aumentou de forma dose-dependente. A conclusão foi de que o TNF- α estimula a transcrição e a secreção de MMP-9 de uma forma dependente do NF- κ B.

3.4. Os polimorfismos do gene TNF- α e o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

O polimorfismo na região promotora do gene TNF- α foi associado com a suscetibilidade ao carcinoma epidermóide de cavidade oral por Liu *et al.* (2005) que detectaram alterações na função imune nestes pacientes. Foram genotipados 192 pacientes com CECP e 146 controles saudáveis, por análise de PCR para os polimorfismos -238 e -308. Encontraram que o alelo -308 TNFG foi maior nos pacientes com CECP e o -308TNFG/A foi menor nesses pacientes. O alelo -238G/A também foi menos encontrado em pacientes com CECP. Os autores concluíram que o polimorfismo na região promotora do TNF- α está associado ao risco de CECP.

Matthias, Harréus e Strange (2006) realizaram um estudo prospectivo incluindo 465 pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço. Trezentos e doze pacientes foram analisados após 5 anos do tratamento cirúrgico curativo. Foram coletados dados clínicos como: idade, gênero, estágio TNM, variação morfológica, tabagismo e etilismo e dados genéticos de enzimas, proteínas reguladoras do ciclo celular e citocina (TNF- α). Um de seus resultados foi que o haplótipo TNFB1D5 teve influência significativa na sobrevida de 5 anos livre de doença. Esse haplótipo pode ser relacionado com a recorrência do tumor. Eles concluíram que apesar de não haver nenhuma dúvida sobre a gênese multifatorial do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, os resultados do estudo suportam a teoria que a gênese e seu prognóstico são fortemente influenciados pelos mecanismos de resposta imune e a regulação do ciclo celular, isto é, a predisposição genética pode influenciar a sobrevida livre de doença após o tratamento curativo.

Gupta *et al.* (2008) estudaram a associação entre os polimorfismos na região promotora dos genes TNF- α e TNFR1 e na região 3'UTR do gene TNFR2 e a susceptibilidade ao carcinoma de boca relacionado ao tabaco. Para esse estudo eles utilizaram 94 pacientes e 133 controles pareados por

idade, sexo e etnia. A técnica de PCR foi utilizada para a genotipagem dos pacientes e controles. Eles observaram que o polimorfismo -308 mostrou diferença significativa entre os pacientes e controles. Os pacientes mostraram uma frequência maior do alelo A na posição -308, já a frequência do alelo G foi significativamente menor entre os pacientes. A frequência do genótipo AG foi duas vezes maior entre os pacientes. Contudo o polimorfismo na posição -238 não mostrou variações entre os pacientes e controles. Esses resultados levaram os autores a concluir que o polimorfismo -308G/A pode estar relacionado com o aumento da susceptibilidade do carcinoma de boca relacionado a tabaco, e que esse polimorfismo pode ser usado como marcador de grupo de risco para o carcinoma oral.

4 LOCAL DE ESTUDO E CASUÍSTICA

4 LOCAL DE ESTUDO E CASUÍSTICA

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis e analisou os polimorfismos do gene *TNF- α* em 188 pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe, atendidos no período de 2001 a 2005, com seguimento mínimo de 24 meses após o término do tratamento inicial, e desenvolvido no Hospital Heliópolis, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e no Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, como parte da casuística do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço (Projeto FAPESP n° 04/12054-9).

Os indivíduos controles (235) foram selecionados entre os pacientes internados no Hospital Heliópolis sem histórico de câncer ou doenças relacionadas com o uso do tabaco e álcool, doenças da cavidade oral, orofaringe, laringe, trato digestório, diabetes, doenças auto-imunes, condições psicóticas, senilidade ou retardo mental e doenças do sistema nervoso central.

As características sócio- demográficas estão sumarizadas na tabela 1.

Tabela 1. Características sócio-demográficas dos indivíduos participantes, de acordo com o grupo de estudo.

Característica	Categoria			Controle		Caso	
				N	%	N	%
Gênero	Feminino			31	13,19	29	15,43
	Masculino			204	86,81	159	84,57
Faixa etária	< 40 anos			15	6,38	7	3,72
	40-49 anos			78	33,19	51	27,13
	50-59 anos			81	34,47	67	35,64
	60-69 anos			44	18,72	40	21,28
	≥ 70 anos			17	7,23	23	12,23
Idade (anos)	Média	±	Desvio	53,44	10,57	55,82	11,33
Etnia	Branco			137	58,30	135	72,19
	Índio			0	0	1	0,53
	Mulato			72	30,64	38	20,32
	Negro			24	10,21	12	6,42
	Oriental			2	0,85	1	0,53
Tabagismo	Não,nunca fumou			44	18,72	16	8,51
	Sim, ainda fuma			117	49,79	136	72,34
	Sim, apenas no passado			74	31,49	36	19,15
Etilismo	Não,nunca bebeu			54	22,98	22	11,70
	Sim, ainda bebe			104	44,26	105	55,85
	Sim, apenas no passado			77	32,77	61	32,45

A maioria dos indivíduos era do gênero masculino (casos e controles). A idade média dos controles foi de 53 anos e para os casos foi de 56 anos aproximadamente.

Foi observada uma proporção maior de pessoas de etnia branca, seja em casos ou controles (58,30% para controles e 72,19% para casos). O tabagismo foi observado em quase 91% dos casos, entre aqueles que ainda fumavam e aqueles que fumaram no passado. Entre os controles observou-se que 81% tinham ainda o hábito de fumar ou tinham fumado no passado, isto é, uma associação estatisticamente significativa para o tabagismo. Em relação ao etilismo, 77% dos controles ainda bebiam ou tinham bebido no passado, enquanto pouco mais de 88% dos casos ainda bebiam ou beberam no passado.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5 MATERIAL e MÉTODOS

5.1. Extração de DNA – Sangue

Para o estudo dos polimorfismos dos genes TNF- α , foram analisadas amostras de sangue de 188 pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe e de 235 controles.

A extração de DNA de sangue foi realizada segundo o protocolo de extração de DNA por sal. Nas amostras onde não foi obtida eficiência por esse método foi realizada a extração por coluna. As colunas utilizadas foram da QUIGEN® - Kit Quia-amp-minikit de extração de DNA genômico de sangue por coluna de sílica.

Para a extração do DNA de sangue, por sal, o sangue periférico coletado de pacientes foi misturado a 25 mL de tampão 1 (Quadro 1) e, em seguida, homogeneizado por inversão e colocado no gelo por 30 minutos. Após esse período, o material sofreu uma centrifugação por 15 minutos a 1800 rpm a 4°C e o sobrenadante descartado. Logo após, 5 mL do tampão 1 (Quadro 2) foram adicionados ao pellet, e foi realizada uma nova centrifugação por 5 minutos a 1800 rpm a 4°C. Posteriormente foi descartado o sobrenadante e o pellet ressuspendido em 3 mL de tampão 2 (Quadro 3) através de agitação (Vórtex). Misturou-se à solução, 10 μ L de proteinase-K e 300 μ L de SDS 10%. Em seguida, a solução foi incubada a 37°C por 16 horas. Após o período de 16 horas, 1 mL de NaCl saturado (6 M) foi incluído à solução, que foi homogeneizada vigorosamente por 15 segundos (Vórtex) e em seguida centrifugada por 20 minutos a 3000 rpm. Logo após, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, com a adição de dois volumes de etanol absoluto em temperatura ambiente, propiciando a precipitação do DNA, que foi içado e lavado em etanol 70% em temperatura ambiente. Posteriormente, o DNA foi dissolvido em um tubo contendo 800 μ L de TE, e incubado a 65°C por 30 minutos para a degradação da proteinase-K e DNAses. Logo após esse período as amostras de DNA foram armazenadas em freezer a -20°C.

1550 mM Cloreto de Amônio	82,91 g
100 mM Carbonato ácido de Potássio	10,01 g
10 mM EDTA, pH 7,4	50 mL de EDTA 0,2 M; pH 7,4
q.s.p 1000 ml de Água Milli-Q	

Quadro 1. Lista de reagentes utilizados para o preparo da solução tampão 1.

100 mM Tris-HCl, pH 8,0	82,91 g
4 M NaCl	10,01 g
EDTA	50 mL de EDTA 0,2 M; pH 7,4
q.s.p. 1000 mL de Água Milli-Q	

Quadro 2. Lista de reagentes utilizados para o preparo da solução tampão 2.

10 mM Tris	1 mL Tris 1 M, pH 7,5
1 mM EDTA	0,5 mL EDTA 0,2 M; pH 7,4
q.s.p. 1000 mL de Água Milli-Q	

Quadro 3. Lista de reagentes utilizados para o preparo da solução de TE (tris-EDTA).

As amostras nas quais a extração por sal se tornaram inviáveis, foram encaminhadas para a extração de DNA por coluna, segundo o protocolo da QUIGEN® minikit de extração DNA genômico de sangue por coluna de sílica.

Foram adicionados aos microtubos (Eppendorff® 1,5 mL) 500 µL de solução de extração e 100 µL de sangue total. Houve a incubação desta solução por 5 minutos em temperatura ambiente, e, logo após, procedeu-se a transferência do material para a coluna de purificação acoplada a um microtubo de 2mL. A solução passou por uma centrifugação de 1 minuto a 8.000 rpm em microcentrífuga Eppendorff® 520R. Após a centrifugação, a solução que passou pela membrana de sílica foi descartada. Acrescentou-se novamente 500 µL de solução de extração para uma nova centrifugação de 1 minuto a 10.000 rpm. Houve o descarte do centrifugado.

Em seguida, procedeu-se a etapa de lavagem do material, através da adição de 500 µL de solução de lavagem “*wash solution*” com etanol e centrifugação por 3 minutos a 13.000 rpm. O centrifugado foi descartado e em seguida a coluna foi transferida a um tubo limpo devidamente etiquetado de 1,5mL (tubo definitivo). Foram adicionados à coluna 100 µL de água autoclavada previamente aquecida a 70°C. Incubou-se a solução em temperatura ambiente por 1 minuto para uma nova centrifugação por 1 minuto a 10.000 rpm. A coluna de sílica foi retirada dos microtubos e o DNA foi armazenado no freezer a -20°C.

5.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Com o DNA extraído, foram realizadas as reações de PCR. *Primers* específicos para o gen *TNF-α* (acesso Genebank: [AY274902](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer)), descritos por Ozen e colaboradores (2002), foram desenhados e utilizados nas reações para delimitar a região genômica amplificada (Quadro 5) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>).

Na reação de PCR serão utilizados de 100 a 200ng de DNA genômico para um volume total de reação de 50-µL, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 200 µmol/L de cada deoxy-NTPs, 1.5 mmol/L de MgCl₂, 1 U *Taq* DNA polimerase (Life Technologies, Inc®, Rockville, MD, USA) e 25 pmol de cada *primer* específico (Biobrás®, São Paulo, SP, Brasil). As condições de ciclagem para gerar o fragmento de 116pb (-308 e -238 *TNF-α*) incluem uma desnaturação por 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, anelamento durante 1 min em temperatura de 58°C e extensão por

1 minuto a 72°C (Quadro 4). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose e corados com brometo de etídio (Figura 2).

Tabela 2. *Primers* utilizados nas reações de PCR para as regiões promotoras do gene *TNF- α* , tamanho dos fragmentos gerados pela reação e temperatura de anelamento das reações.

GENE	POSIÇÃO	SEQUÊNCIA	FRAGMENTO	TA
<i>TNF-α</i>	-308 G>A	F: - 5'AGG CAA TAG GTT TTG AGG G <u>CC</u> AT 3'	116pb	58°C
	-238 G>A	R: - 5' ACT CCC CAT CCT CCC TGG <u>TC</u> 3'		

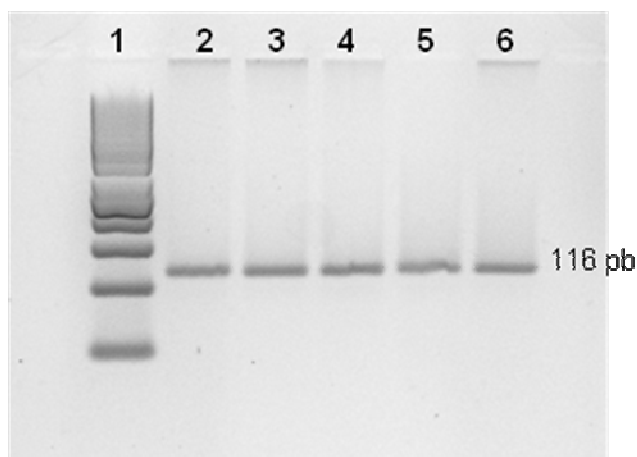


Figura 2. Fotografia de gel de agarose 2% corado com brometo de etídio com a amplificação do fragmento de 116pb do gene do *TNF- α* . As colunas 2 a 6 referem-se aos produtos amplificados e a coluna 1 refere-se ao marcador de peso molecular de 100 pares de base.

Os primers do gene *TNF- α* e os polimorfismos estão localizados na seqüência a seguir (Quadro 4). *Primers* com bases modificadas foram

desenhados para a amplificação do gene TNF- α a fim de criar um sítio de reconhecimento das enzimas NcoI (polimorfismo -308) AuaI (polimorfismo -238).

LOCUS AY274902 1236 bp DNA linear PRI 12-DEC-2003

DEFINITION Homo sapiens DT3 tumor necrosis factor (TNF) gene, TNFp*007 allele, promoter region and 5'UTR.

ACCESSION AY274902

VERSION AY274902.1 GI:31377868 SOURCE Homo sapiens (human)

```
1 gccgccagac tgctgcaggg gaagcaaagg agaagctgag aagatgaagg aaaagtcagg
61 gtctggaggg gcgggggtca gggagctcct gggagatatg gccacatgta gcggctctga
121 ggaatgggtt acaggagacc tctggggaga tgtgaccaca gcaatgggta ggagaatgtc
181 cagggctatg gaagtcgagt atggggaccc cccctaacg aagacagggc catgtagagg
241 gcccagggga gtgaaagagc ctccaggacc tccaggtatg gaatacaggg gacgtttaag
301 aagatatggc cacacactgg ggccctgaga agtgagagct tcatgaaaaa aatcagggac
361 ccagagttc cttggaagcc aagactgaaa ccagcattat gagtctccgg gtcagaatga
421 aagaagaagg cctgccccag tggggctctgt gaattcccgg gggtgatttc actccccggg
481 gctgtcccag gcttgcctt gctaccccc cccagccttt cctgaggcct caagcctgcc
541 accaagcccc cagctccttc tccccgagg gaccxaaaca caggcctcag gactcaaac
601 agctttccc tccaaccccg tttctctcc ctcaaggact cagctttctg aagcccctcc
661 cagttctagt tctatcttt tctgcatcc tctctggaag ttagaaggaa acagaccaca
721 gacctgtcc ccaaaagaaa tggaggcaat aggttttgag ggccatgggg acggggttca
781 gcctccaggg tctacacac aaatcagtca gtggcccaga agacccccct cagaatcgga
841 ccagggagga tggggagtgt gaggggtatc ctgatgctt gtgtgtcccc aactttcaa
901 atccccgccc ccgcatgga gaagaaaccg agacagaagg tgcagggccc actaccgctt
```

Quadro 4. *Primers* para as reações de PCR da região promotora do gene TNF- α mostrando o *primer forward* com a base modificada - c sublinhada (mudança de g para c no *primer*). O *primer reverse* contém a base c sublinhada (mudança de g para c).

5.3. Digestão com enzimas de restrição

Para as reações de digestão de cada fragmento específico, obtidos através da PCR, foram utilizados 10 μ L do produto de PCR para 0,5 μ L das enzimas *Nco*I e *Av*all (5U; New England Biolabs, Beverly, MA, USA), 2 μ L de 10X NEBuffer 2 e 0,2 μ L de *bovine serum albumin* (100mgL⁻¹) para um volume final de 20 μ L de reação. Estes componentes foram incubados em temperatura específica conforme a orientação do fabricante, e após o término da reação, 10 μ L da reação de digestão foram misturados ao corante *Loading Buffer* e submetidos à eletroforese em gel e corado com brometo de etídio (1mg/mL).

5.4. Forma de análise dos resultados do estudo dos polimorfismos

O programa de análise de imagens utilizado para a visualização das imagens obtidas nos géis de PCR e digestão foi o Gel Quant Olympus® Camedia C-5060 Wide Zoom.

O polimorfismo -308 do gene TNF- α (G \rightarrow A) abole um sítio de restrição para a enzima *Nco*I. A endonuclease de restrição reconhece o sítio CCATGG (Figura 3). Indivíduos do tipo homozigotos selvagem foram identificados no gel através de duas bandas produtos de digestão com 96 e 20 pares de base. Indivíduos heterozigotos para o polimorfismo apresentaram um padrão com 3 bandas com 116, 96 e 20 pares de base. Os indivíduos homozigotos para o polimorfismo apresentaram uma única banda com 116 pares de base como mostrado na Figura 4.

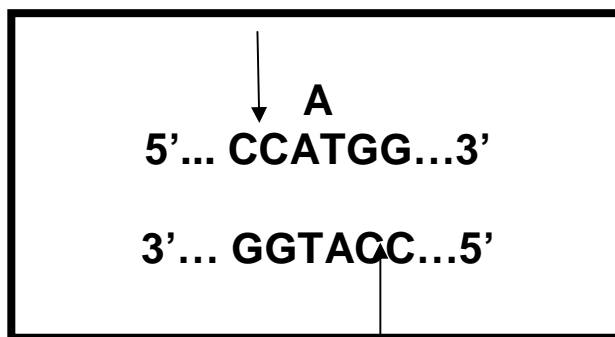


Figura 3. Sítio de reconhecimento da endonuclease de restrição *NcoI*, com a substituição de uma guanina por uma adenina.

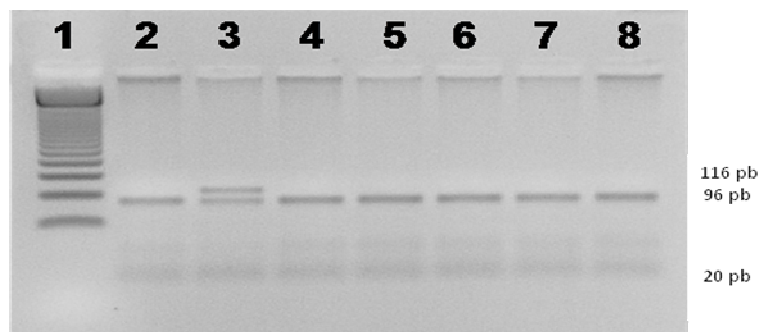


Figura 4. Fotografia de gel agarose 3% corado com brometo de etídio onde visualizamos os resultados da reação de digestão com os fragmentos do gene *TNF- α* na posição -308. As colunas 2 a 8 referem-se aos produtos amplificados e a coluna 1 refere-se ao marcador de peso molecular de 100 pares de base.

O polimorfismo -238 do gene *TNF- α* (G→A) abole um sítio de restrição para a enzima *Avall*. A endonuclease de restrição reconhece o sítio GGWCC (W=A ou T) (Figura 5). Indivíduos do tipo homocigoto selvagem foram identificados no gel através de duas bandas de produtos de digestão com 96 e 20 pares de base. Indivíduos heterocigotos para o polimorfismo apresentaram um padrão com 3 bandas com 116, 96 e 20 pares de base. Os indivíduos homocigotos para o polimorfismo apresentaram uma única banda com 116 pares de base como mostrado na Figura 6.

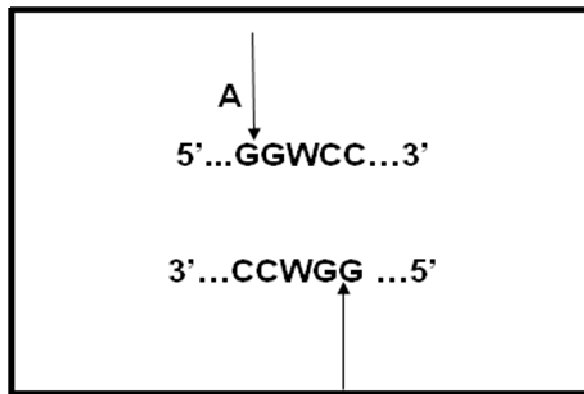


Figura 5. Sítio de reconhecimento da endonuclease de restrição *Avall*, com a substituição de uma guanina por uma adenina.



Figura 6. Fotografia do gel de agarose 3% corado com brometo de etídio com os fragmentos de digestão do gene do *TNF- α* para o polimorfismo -238. As colunas 2, 3 e 4 apresentam indivíduos sem polimorfismo, as colunas 5 a 8 apresentam indivíduos heterozigotos. Na coluna 1 está o marcador de peso molecular de 100 pares de base.

5.5. Método Estatístico

Foi calculado o equilíbrio de Hardy-Weinberg em relação aos polimorfismos -308 e -238 do gene *TNF- α* .

Para as variáveis qualitativas foram calculadas as frequências e porcentagens, enquanto que para as variáveis quantitativas foram calculadas médias e desvio padrão.

Foram então realizados testes de qui-quadrado de Pearson e T de Student.

Para a avaliação dos fatores de risco da doença foi utilizada a regressão logística para calcular o *odds ratio* com intervalo de confiança de 95%.

Em relação à avaliação de sobrevida à doença foi realizada a construção de uma tabela de vida pelo método atuarial com probabilidades calculadas de 1 a 5 anos.

Foram realizadas curvas de sobrevida pelo método de Kaplan- Meier e comparadas pelo teste de *log-rank* com o cálculo do valor de *p*.

Para a avaliação dos fatores prognósticos foi utilizada a regressão de Cox univariada e múltipla para cálculo de *hazard ratio* não ajustado e ajustado com intervalo de confiança.

Os softwares estatísticos utilizados para a análise foram Stata 8.0 for Windows e SPSS 12.0 for Windows.

5.6. Aspectos Éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Heliópolis, em 10 de junho de 2008, sob o número 620. É subprojeto do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço, também aprovado pelo CEP do Hospital Heliópolis sob número 386 aprovado em 15 de abril de 2005.

O material utilizado para a realização do estudo consistiu em amostras de sangue. Do sangue coletado foi extraído o DNA e armazenado de acordo com as normas técnicas do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis, fazendo parte do acervo de material do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço e são da responsabilidade da Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva.

Os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço.

A relação entre a genética e os benefícios diretos aos pacientes está bem estabelecida em câncer medular de tireóide, câncer de mama e cólon, na qual marcadores moleculares são utilizados na prática clínica. Porém, para os marcadores em questão, ainda em estudos preliminares, muito possivelmente, não haverá benefícios diretos em decorrência da pesquisa aos pacientes deste

estudo, no entanto, os resultados poderão beneficiar, no futuro, outros pacientes.

Os resultados obtidos deste trabalho serão enviados à publicação em revista científica, garantido o sigilo e respeito à confidencialidade dos sujeitos envolvidos no trabalho.

6 RESULTADOS

A primeira parte do resultado corresponde à descrição do estudo caso-controle e análise estatística dos fatores preditores para a doença. Na segunda parte apresentamos os resultados relacionados à análise de sobrevida dos pacientes em relação à sobrevida específica pela doença e sobrevida global.

6.1. Estudo de caso-controle: Fatores relacionados com carcinoma epidermóide de boca e orofaringe

6.1.1. Variáveis em estudo

As principais variáveis independentes foram as relacionadas com os polimorfismos TNF-308 e TNF-238. As outras variáveis independentes foram: gênero, idade, etnia, escolaridade, tabagismo e etilismo.

As frequências alélicas dos polimorfismos nas posições -308 e -238 estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p = 0,006$ e $p = 0,254$, respectivamente).

Na tabela 3 apresentamos as frequências alélicas dos polimorfismos genéticos TNF-308 e TNF-238.

Tabela 3. Frequência genotípica do TNF-308 e TNF-238 dos indivíduos participantes do estudo.

Característica	Categoria	Controle		Caso		p
		N	%	N	%	
TNF -308	G/G	192	81,70	140	74,47	0,072 [§]
	G/A + A/A	43	18,30	48	25,53	
TNF -238	G/G	205	87,23	167	88,83	0,616 [§]
	G/A + A/A	30	12,77	21	11,17	

§ Teste qui-quadrado de Pearson.

Não foram encontradas associações significantes entre as frequências dos genótipos dos diferentes polimorfismos genéticos estudados em relação à doença. Para TNF-308, a frequência do genótipo G/G foi maior entre controles (81,70%) comparados com os casos (74,47%). Para o polimorfismo genético TNF-238 encontrou-se uma maior frequência de casos entre o genótipo G/G (87,23% em controles e 88,83% em casos).

6.1.2. Regressão logística

Com o objetivo de analisar as variáveis relacionadas como fator de risco para doença foi utilizada a regressão logística. Nas tabelas 4 e 5 apresentamos os resultados da regressão logística univariada, com os cálculos de *odds ratio* (OR), intervalos com 95% de confiança para OR e os valores p para esses valores de OR.

Tabela 4. Análise dos polimorfismos -308 e -238 como fatores de risco para a doença.

característica	Categoria	Odds ratio não ajustado	Intervalo de confiança	p
TNF-308	G/G	1,00		

TNF-238	G/A+A/A	1,53	0,96-2,44	0,073
	G/G	1,00		
	G/A +A/A	0,86	0,47-1,56	0,617

A partir da tabela 4 observamos que não houve significância entre os dois polimorfismos estudados, isto é, não podemos considerá-los como fator de risco ou fator de proteção ao carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

Tabela 5. Análise das variáveis epidemiológicas como fatores de risco da doença.

Característica	Categoria	Odds ratio não ajustado	Intervalo de confiança	p
Gênero	Feminino	1,00		
	Masculino	0,83	0,48-1,44	0,513
Faixa etária	<40 anos	1,00		
	40-49 anos	1,40	0,53-3,67	0,493
	50-59 anos	1,77	0,68-4,60	0,239
	60-69 anos	1,95	0,72-5,26	0,189
	≥ 70 anos	2,90	0,97-8,66	0,057
Tabagismo	Não,nunca fumou	1,00		
	Sim, ainda fuma	1,34	0,67-2,69	0,413
	Sim,apenas no passado	3,20	1,71-5,96	<0,001
Etilismo	Não,nunca bebeu	1,00		
	Sim, ainda bebe	1,94	1,07-3,54	0,030
	Sim, apenas no passado	2,48	1,41-4,36	0,002

A partir da tabela 5 podemos observar as variáveis que resultaram estatisticamente significantes e relacionadas com a doença. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para gênero e faixa etária. Tabagismo e etilismo foram variáveis associadas estatisticamente com a doença e possíveis candidatas para a construção do modelo de regressão

logística múltipla, além das variáveis relacionadas aos polimorfismos genéticos, que foram igualmente consideradas em virtude do objetivo da pesquisa, ainda que não fossem estatisticamente significantes.

Utilizou-se o método *stepwise forward*, que permite que as variáveis candidatas ao modelo múltiplo entrem uma a uma no modelo. A ordem foi estabelecida de acordo com o valor p (em forma crescente) e em caso de empate o OR maior era selecionado entre as duas variáveis.

Na tabela 6 apresentamos o modelo de regressão logística final.

Tabela 6. Distribuição das razões de risco de apresentar a doença.

Característica	Categoria	Odds ratio não ajustado	Odds ratio ajustado	Intervalo de confiança	p
Tabagismo	Não,nunca fumou	1,00	1,00		
	Sim, ainda fuma	1,34	1,07	0,51-2,22	0,863
	Sim,apenas no passado	3,20	2,55	1,32-4,89	0,005
Etilismo	Não,nunca bebeu	1,00	1,00		
	Sim, ainda bebe	1,94	1,87	0,99-3,54	0,053
	Sim, apenas no passado	2,48	1,86	1,02-3,40	0,042
TNF -308	G/G	1,00	1,00		
	G/A + A/A	1,53	1,45	0,89-2,35	0,133
TNF -238	G/G	1,00	1,00		
	G/A +A/A	0,86	0,88	0,48-1,62	0,681

Na tabela 6 as variáveis que resultaram como fatores independentes da doença foram o tabagismo e etilismo, isto é, indivíduos que fumam têm 3,2 vezes mais risco de ter carcinoma epidermóide de boca ou orofaringe do que os indivíduos que nunca fumaram. Indivíduos que bebem têm 2,48 vezes mais risco de terem carcinoma de boca e orofaringe comparado a pessoas que não bebem. Os polimorfismos genéticos TNF-308 e TNF-238 não resultaram fatores independentes relacionados com a doença.

6.2. Fatores prognósticos

Dos 188 casos participantes do estudo caso-controle, obtivemos informação de seguimento de 186 casos. A partir do tempo de seguimento e do status vital do paciente realizamos a análise de sobrevida específica pela doença e sobrevida global.

6.2.1. Variáveis em estudo

As variáveis independentes consideradas neste estudo foram: gênero, faixa etária, escolaridade, etnia, tabagismo, etilismo, diferenciação, embolização sangüínea, embolização linfática, infiltração perineural, infiltração inflamatória, estadiamento TNM, linfonodo comprometido e invasão extracapsular, assim como as variáveis TNF-308 e TNF-238 consideradas como as principais variáveis. Na tabela 7 são apresentadas as freqüências e porcentagens das variáveis analisadas.

Tabela 7. Distribuição das freqüências alélicas do TNF-308 e TNF-238 segundo a condição da última avaliação.

Característica	Categoria	Vivo (N=107)		Morto (N=76)		p
		N	%	N	%	
TNF -308	G/G	74	69,2	61	80,3	0,092 [§]
	G/A+A/A	33	30,8	15	19,7	

TNF -238	G/G	93	86,9	69	90,8	0,418 [§]
	G/A + A/A	14	13,1	7	9,2	

§ Teste qui-quadrado de Pearson.

6.2.2. Análise de sobrevida

O tempo desde a cirurgia até a morte pela doença foi calculado para a sobrevida específica.

As curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier são apresentadas na figura 7 para a curva de sobrevida global e na figura 8 para a curva de sobrevida específica pela doença. As probabilidades de sobrevida acumulada de 1 a 5 anos foram calculados pelo método de tabelas de vida (ou método atuarial) e são apresentadas na tabela 8.

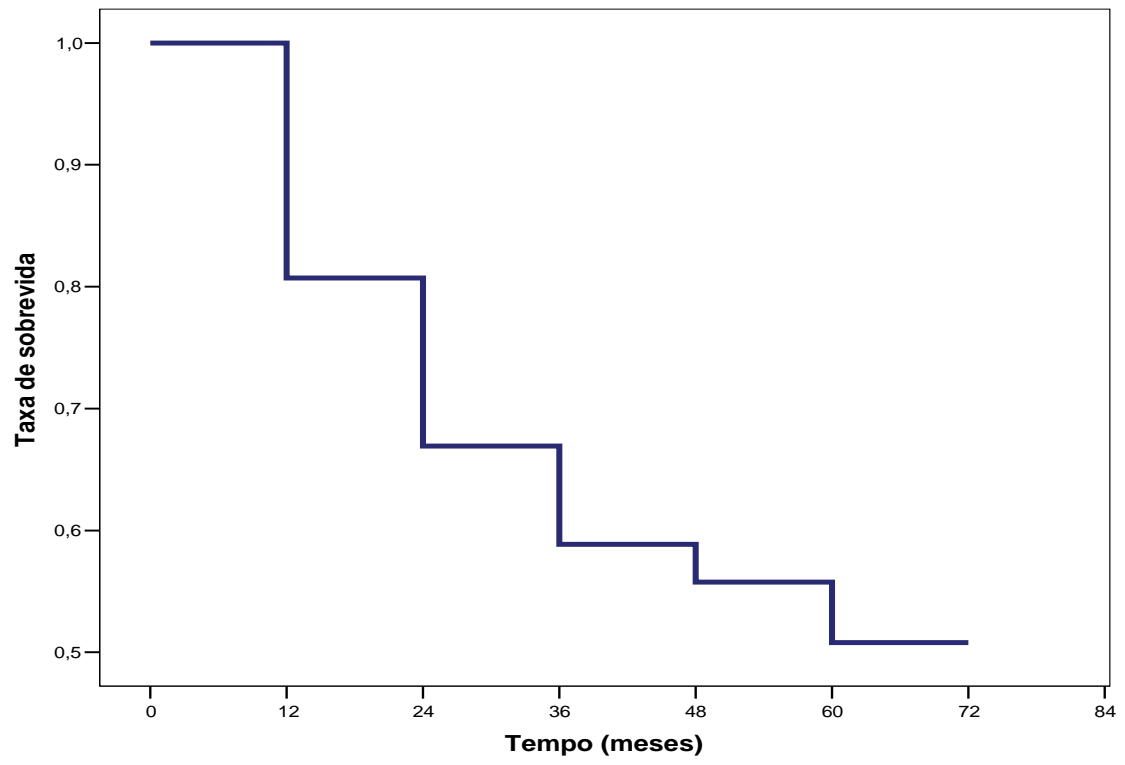


Figura 7. Curva de sobrevivência global.

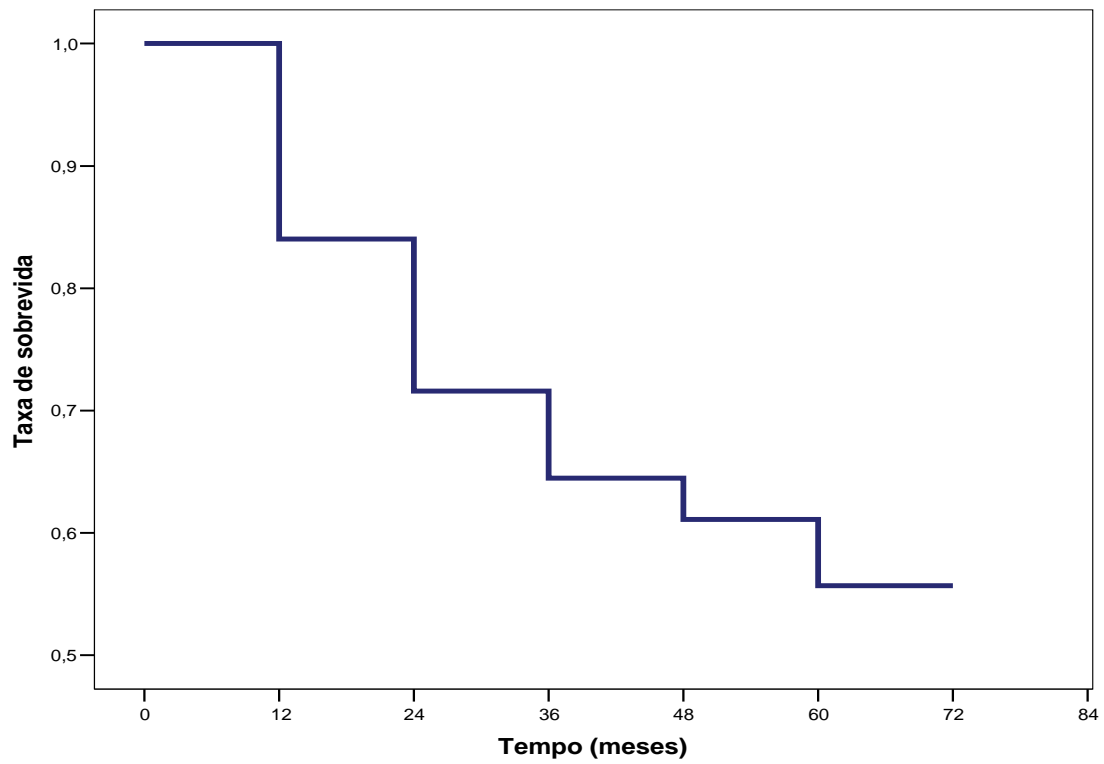


Figura 8. Curva de sobrevivida específica pela doença.

Tabela 8. Análise da probabilidade de sobrevivida específica e global.

Sobrevida	Mediana (meses)	Probabilidade de sobrevida				
		1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
Específica	60	0,84	0,72	0,64	0,61	0,56
Global	60	0,81	0,67	0,59	0,56	0,51

Para avaliar os fatores prognósticos relacionados com a sobrevida específica dos pacientes utilizou-se a regressão de Cox. Na tabela 9 são apresentados os valores dos *hazard ratio* (HR) para as variáveis independentes analisadas. Algumas variáveis independentes não foram analisadas devido ao número pequeno de casos apresentados.

Da tabela 9 observamos que nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa em relação à sobrevida dos pacientes. Mesmo assim, as variáveis relacionadas aos polimorfismos genéticos TNF-308 e TNF-238 serão incluídas no modelo final de regressão de Cox por ser de interesse da pesquisa.

Tabela 9. Distribuição das razões de risco para a análise de sobrevida específica.

Característica	Categoria	Hazard ratio (HR)	Intervalo de confiança	p
Gênero	Feminino	1,00		
	Masculino	1,12	0,55-2,27	0,751
Faixa etária	<40 anos	1,00		
	40-49 anos	0,49	0,17-1,45	0,198
	50-59 anos	0,52	0,18-1,51	0,232
	60-69 anos	0,47	0,15-1,46	0,193
	≥ 70 anos	0,26	0,07-0,98	0,047
Tabagismo	Não,nunca fumou	1,00		
	Sim, ainda fuma	1,50	0,41-5,44	0,540
	Sim,apenas no passado	2,25	0,70-7,20	0,173
Etilismo	Não,nunca bebeu	1,00		
	Sim, ainda bebe	0,95	0,38-2,39	0,912
	Sim, apenas no passado	1,44	0,61-3,39	0,407
TNF -308	G/G	1,00		
	G/A + A/A	0,81	0,45-1,44	0,472
TNF -238	G/G	1,00		
	G/A +A/A	0,61	0,24-1,52	0,286

As variáveis relacionadas com as características do tumor apresentaram maior associação com a sobrevida específica dos pacientes (Tabela 10). Pacientes com tumores pouco diferenciados tiveram quase 4 vezes mais risco

de óbito devido ao carcinoma, quando comparados com pacientes com tumores bem diferenciados. Pacientes que apresentaram embolização linfática têm 2,13 vezes mais risco de óbito. Tumores T3-T4 estão associados com piora da sobrevida específica dos pacientes; assim como pacientes com linfonodo comprometido.

Tabela 10. Distribuição das razões de risco para as variáveis histopatológicas.

Característica	Categoria	Hazard ratio (HR)	Intervalo de confiança	p
Diferenciação	Bem diferenciado	1,00		
	Moderadamente	0,85	0,50-1,42	0,527
	Pouco diferenciado	3,86	1,57-9,48	0,003
Embolização sangüínea	Ausente	1,00		

	Presente	2,31	0,99-5,38	0,052
Embolização linfática	Ausente	1,00		
	Presente	2,13	1,26-3,59	0,005
Invasão perineural	Ausente	1,00		
	Presente	0,87	0,50-1,49	0,603
Infiltração inflamatória	Escasso	1,00		
	Moderado	1,80	0,96-3,35	0,065
	Intenso	1,08	0,38-3,02	0,888
TNM categorizado	T1-T2	1,00		
	T3-T4	1,71	1,04-2,84	0,036
Linfonodo comprometido	Ausente	1,00		
	Presente	3,10	1,78-5,39	<0,001
Invasão extracapsular	Ausente	1,00		
	Presente	1,43	0,75-2,73	0,281

Nas figuras 9 e 10 apresentamos as curvas de sobrevida para o TNF-308 e TNF-238, também os valores de p para o teste log-rank de comparação de curvas de sobrevida. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as curvas de sobrevida das freqüências alélicas do polimorfismo genético TNF-308 ($p=0,471$).

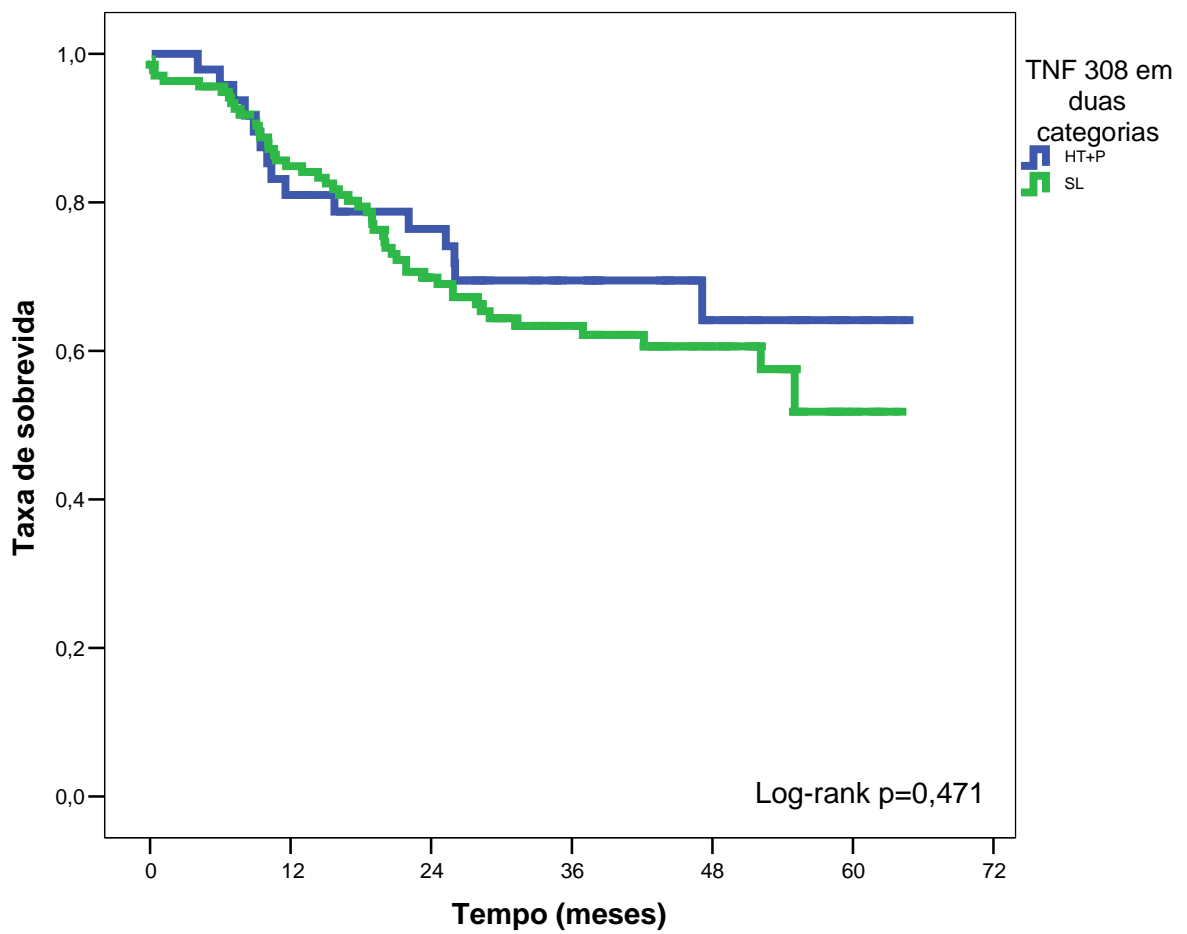


Figura 9. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para TNF-308.

As evidências estatísticas permitem dizer que não existem diferenças significativas entre as curvas de sobrevida das freqüências alélicas do polimorfismo genético TNF -238 ($p=0,281$).

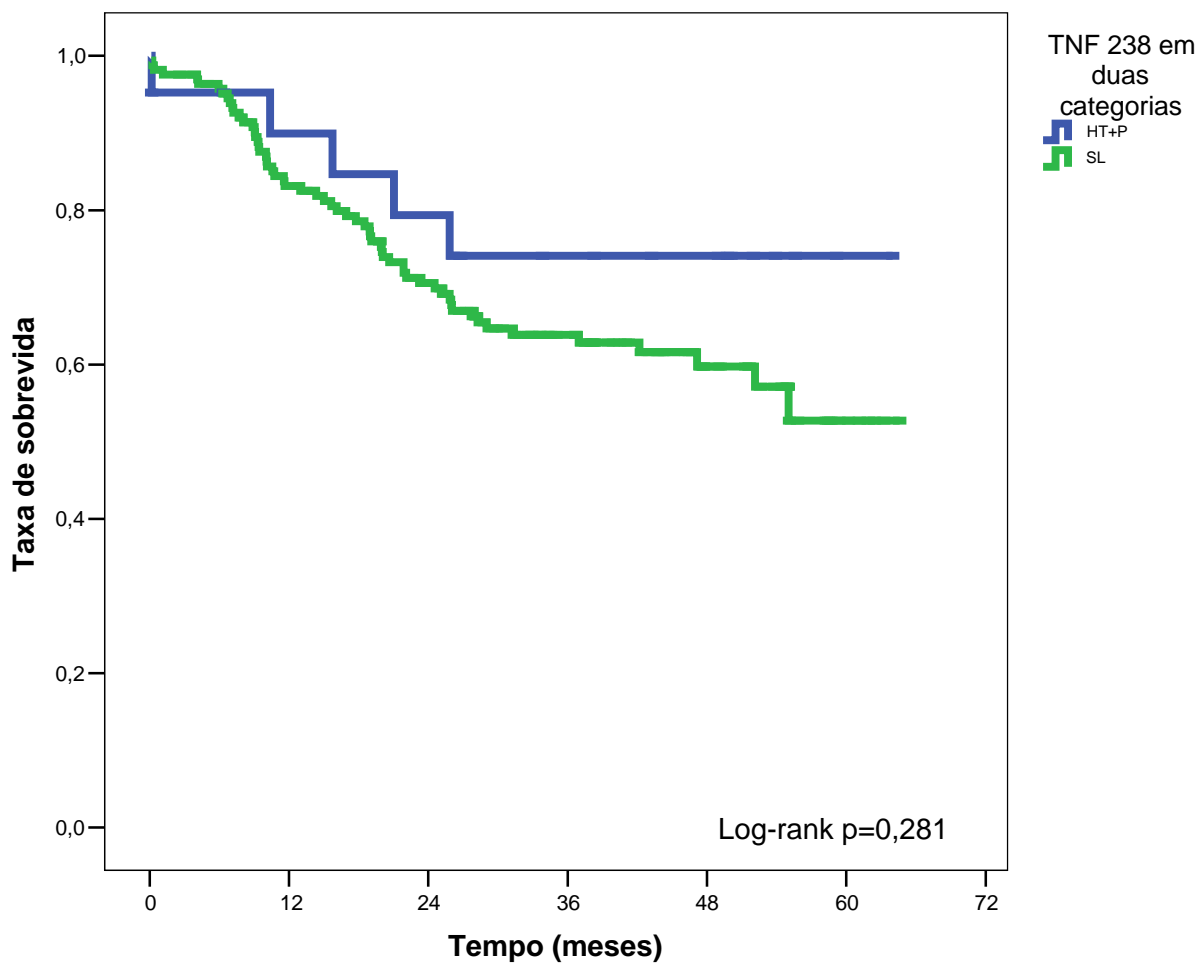


Figura 10. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier para TNF-238.

Na tabela 11 apresentamos o modelo final de sobrevida para os pacientes com carcinoma de boca e orofaringe. Pacientes com tumor pouco diferenciado, embolização sangüínea, estadiamento T3-T4 e linfonodo comprometido têm pior sobrevida. As variáveis: infiltração linfática assim como TNF-308 e TNF-238 não estão associadas independentemente com a sobrevida dos pacientes. Este modelo foi ajustado por tabagismo e etilismo.

Tabela 11. Distribuição das razões de risco ajustada para a análise de sobrevida.

Característica	Categoria	Hazard ratio não ajustado	Hazard ratio ajustado	Intervalo de confiança	p
Diferenciação	Bem diferenciado	1,00	1,00		
	Moderadamente	0,85	0,65	0,36-1,19	0,166
	Pouco diferenciado	3,86	2,88	1,02-8,17	0,047
Embolização sangüínea	Ausente	1,00	1,00		
	Presente	2,31	3,54	1,31-9,54	0,013
Embolização linfática	Ausente	1,00	1,00		
	Presente	2,13	1,57	0,82-3,02	0,172
TNM categorizado	T1-T2	1,00	1,00		
	T3-T4	1,71	2,53	1,39-4,60	0,002
Linfonodo comprometido	Ausente	1,00	1,00		
	Presente	3,10	3,80	2,01-7,19	<0,001
TNF -308	G/G	1,00	1,00		
	G/A+A/A	0,81	0,64	0,34-1,24	0,186

TNF -238	G/G	1,00	1,00		
	G/A+A/A	0,61	1,08	0,42- 2,81	0,869

6.3. Análise dos polimorfismos em conjunto

Na terceira parte do nosso estudo, os polimorfismos genéticos TNF -308 e TNF -238 foram estudados em conjunto, considerando as suas freqüências alélicas. De acordo com o novo agrupamento os grupos de estudo foram:

- Grupo 1: TNF 308 G/G e TNF 238 G/A+A/A
- Grupo 2: TNF 308 G/A+A/A e TNF 238 G/G

O grupo 1 foi escolhido pela associação de polimorfismos com as características de menor risco e prognóstico para o câncer de boca e orofaringe, segundo a literatura, e no grupo 2 foram colocados os pacientes que possuíam o genótipo de maior risco. Os pacientes com outras relações de genótipos foram descartados dessa avaliação.

Nesta análise estatística foram considerados somente os pacientes com tumores de boca e orofaringe com informação de seguimento. A primeira parte da análise está relacionada com a associação entre estes polimorfismos genéticos e as variáveis clínicas e histopatológicas. A segunda parte da análise está relacionada com a sobrevida dos pacientes considerando esta nova agrupação.

6.3.1. Associação entre os polimorfismos genéticos e as variáveis clínicas e histopatológicas.

Nas tabelas 12 e 13 são apresentadas as freqüências das variáveis em estudo segundo os grupos de freqüências alélicas dos polimorfismos genéticos TNF -308 e TNF -238. Foi utilizado o teste de associação qui-quadrado de Pearson para experimentar a associação entre variáveis categóricas, e o teste t de Student para comparação de médias da variável idade (em anos) nos dois grupos de polimorfismos genéticos.

Não se observou associação estatisticamente significativa entre gênero, faixa etária, consumo de tabaco e consumo de álcool entre os grupos TNF -308 G/G , TNF- 238 G/A+A/A e TNF -308 G/A+A/A e TNF -238 G/G. Na comparação das médias das idades entre os dois grupos, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (p=0,496) (Tabela 12).

Considerando as características histopatológicas, não encontramos associação estatisticamente significativa entre as variáveis estudadas e os grupos de polimorfismos genéticos (Tabela 13).

Tabela 12. Características clínicas dos grupos de maior risco e de menor risco.

Característica	Categoria	-308G/G -238 G/A+A/A		-308G/A+A/A -238 G/G		P
		N	%	N	%	
Gênero	Feminino	2	13,3	6	14,3	0,927 [§]
	Masculino	13	86,7	36	85,7	
Faixa etária	<40 anos	0	0	2	4,8	0,619 [§]
	40-49 anos	3	20,0	13	31,0	
	50-59 anos	8	53,3	16	38,1	
	60-69 anos	4	26,7	9	21,4	
	≥ 70 anos	0	0	2	4,8	
Idade em anos	Média (Desvio padrão)	55,13 (6,88)		53,12 (10,5)		0,496 [¥]
Tabagismo	Não,nunca fumou	2	13,3	4	9,5	0,891 [§]
	Sim, ainda fuma	11	73,3	31	73,8	
	Sim,apenas no passado	2	13,3	7	16,7	
Etilismo	Não,nunca bebeu	2	13,3	6	14,3	0,957 [§]
	Sim, ainda bebe	7	46,7	21	50,0	
	Sim, apenas no passado	6	40,0	15	35,7	

§ Teste qui-quadrado de Pearson. ¥ Teste t de Student.

Tabela 13. Análise comparativa das características histológicas do tumor.

Característica	Categoria	-308G/G -238 G/A+A/A		-308G/A+A/A -238 G/G		p		
		N	%	N	%			
Sítio	Orofaringe	1	6,7	10	23,8	0,149 [§]		
	Boca	14	93,3	32	76,2			
Subsítio	Língua e soalho	8	53,3	26	61,9	0,071 [§]		
	Gengiva	2	13,3	5	11,9			
	Área retromolar	3	20,0	1	2,4			
	Palato	1	6,7	0	0			
	Tonsila	0	0	8	19,0			
	Base de língua	0	0	1	2,4			
	Orofaringe (soe)	1	6,7	1	2,4			
	Diferenciação	Bem diferenciado	4	26,7	19		46,3	0,310 [§]
		Moderadamente	11	73,3	21		51,2	
Pouco diferenciado		0	0	1	2,4			
Embolização sangüínea	Ausente	12	100	34	87,2	0,192 [§]		
	Presente	0	0	5	12,8			
Embolização linfática	Ausente	10	83,3	23	59,0	0,123 [§]		
	Presente	2	16,7	16	41,0			
Infiltração inflamatória	Ausente	1	7,7	1	2,6	0,417 [§]		
	Presente	12	92,3	37	97,4			
PT	T1-T2	9	60,0	18	42,9	0,254 [§]		
	T3-T4	6	40,0	24	57,1			
pN	0	11	91,7	19	76,0	0,255 [§]		
	1	1	8,3	6	24,0			
Linfonodo comprometido	Ausente	11	73,3	19	45,2	0,061 [§]		
	Presente	4	26,7	23	54,8			
Invasão extracapsular	Ausente	2	50,0	14	82,4	0,172 [§]		
	Presente	2	50,0	3	17,6			

6.3.2. Análise de sobrevivência

A tabela 14 apresenta as frequências para as características dos pacientes segundo status vital.

Para o gênero, faixa etária, etnia, escolaridade, tabagismo e etilismo não se encontraram associações estatisticamente significativas entre os grupos segundo status vital. Considerando as médias das idades entre os pacientes vivos e os óbitos, não se encontrou nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,802$).

Tabela 14. Análise da sobrevivência dos pacientes estudados.

Característica	Categoria	Vivo		Morto		p
		N	%	N	%	
Gênero	Feminino	7	17,9	1	5,6	0,211§
	Masculino	32	82,1	17	94,4	
Faixa etária	<40 anos	2	5,1	0	0	0,709§
	40-49 anos	10	25,6	6	33,3	
	50-59 anos	16	41,0	8	44,4	
	60-69 anos	9	23,1	4	22,2	
	≥ 70 anos	2	5,1	0	0	
Idade em anos	Média (Desvio padrão)	53,87 (10,29)		53,17 (8,65)		0,802¥
Tabagismo	Não, nunca fumou	5	12,8	1	5,6	0,708§
	Sim, ainda fuma	28	71,8	14	77,8	
	Sim, apenas no passado	6	15,4	3	16,7	
Etilismo	Não, nunca bebeu	7	17,9	1	5,6	0,449§
	Sim, ainda bebe	18	46,2	10	55,6	
	Sim, apenas no passado	14	35,9	7	38,9	

§ Teste qui-quadrado de Pearson. ¥ Teste t de Student.

Curvas de sobrevida pela doença global e sobrevida específica são apresentadas nas figuras 11 e 12. Consideraram-se somente os casos com informação de seguimento para os grupos de polimorfismos genéticos estudados.

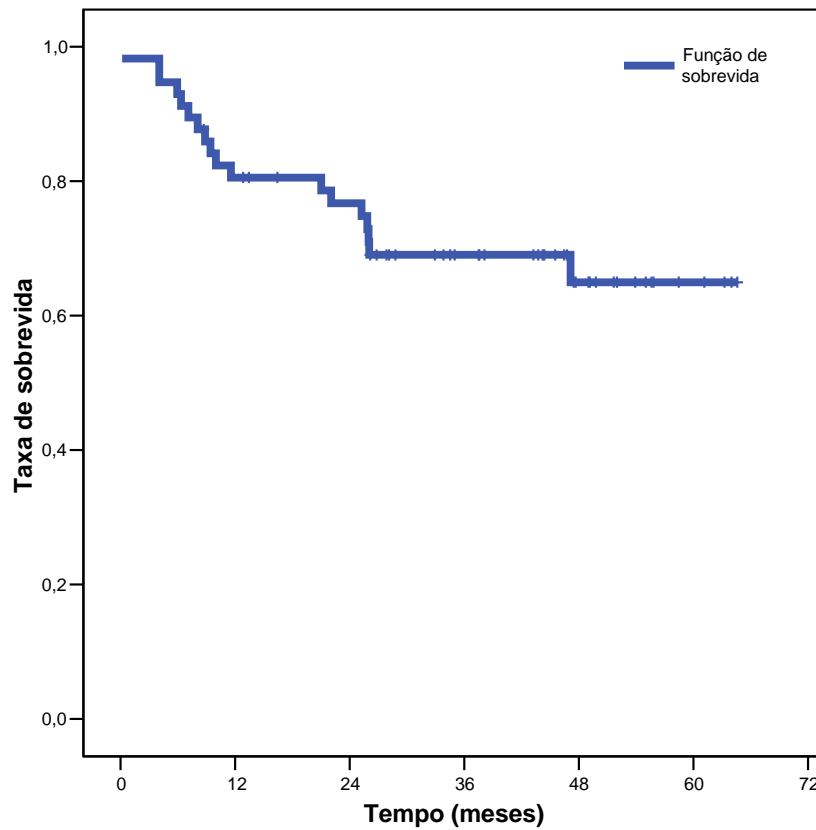


Figura 11. Curva de sobrevida global dos grupos de polimorfismos agrupados

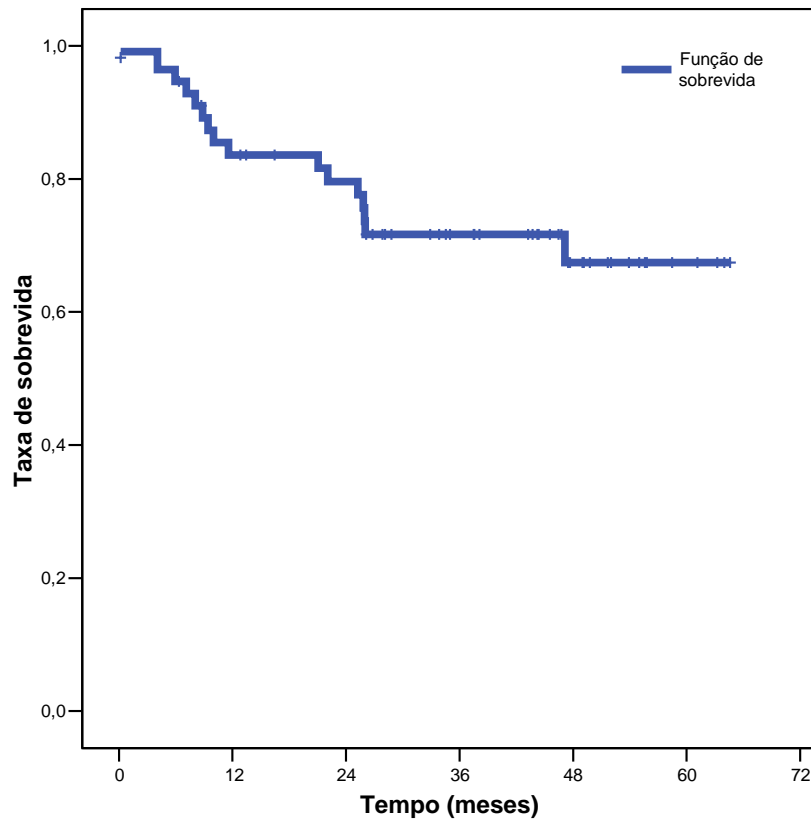


Figura 12. Curva de sobrevivência específica pela doença dos grupos de polimorfismos agrupados.

As probabilidades de sobrevivência acumulada de 1 a 5 anos foram calculadas pelo método de tabelas de vida (ou método atuarial), assim como a mediana do tempo de sobrevivência, seja para a sobrevivência específica como para a sobrevivência global. Elas são apresentadas na tabela 15.

Tabela 15. Análise da probabilidade de sobrevivência específica e global.

Sobrevivência	Mediana	Probabilidade de sobrevivência
---------------	---------	--------------------------------

		(meses)				
		1 ano	2 anos	3 anos	4 anos	5 anos
Específica	60	0,84	0,80	0,71	0,68	0,68
Global	60	0,81	0,77	0,68	0,65	0,65

Observou-se que 84% dos pacientes sobrevive ao primeiro ano logo após o diagnóstico de câncer, a sobrevida específica de 5 anos foi de 68%. No caso de sobrevida global (levando em consideração todas as causas de morte) a sobrevida de 5 anos foi 65%.

Modelo de regressão de Cox

Para avaliar os fatores prognósticos relacionados com a sobrevida específica dos pacientes utilizou-se o modelo de regressão de Cox. Na tabela 17 são apresentados os valores dos *hazard ratio* (HR) para as variáveis independentes analisadas. Algumas variáveis independentes não foram analisadas devido ao número pequeno de casos apresentados o que não permitiu os cálculos dos HR.

Da tabela 16 observamos que pacientes com tumor pouco diferenciado têm uma pior sobrevida quando comparados com pacientes com tumores bem diferenciados (HR=65,58; p=0,004). Pacientes com embolização sanguínea também apresentam uma piora da sobrevida (HR=4,84; p=0,018). Pacientes em estadiamento clínico T3 ou T4 apresentam uma pior sobrevida quando comparados aos casos T1 ou T2 (HR=3,71; p=0,024). A presença de linfonodos também foi encontrada como um fator de piora da sobrevida em pacientes com tumores de orofaringe e boca (HR=3,51; p=0,030).

Tabela 16: Distribuição das razões de chance para a análise de sobrevida nos dois grupos estudados.

Característica	Categoria	Hazard ratio (HR)	Intervalo de 95% de confiança para HR	p
----------------	-----------	-------------------	---------------------------------------	---

Gênero	Feminino	1,00		0,331
	Masculino	2,73	0,36-20,71	
Etilismo	Não,nunca bebeu	1,00		0,377
	Sim, ainda bebe	2,57	0,32-20,90	
	Sim, apenas no passado	2,31	0,29-18,46	
TNF -308+-238	-308G/G;- 238G/A+A/A	1,00		0,493
	-308G/A+A/A; -238G/G	1,55	0,44-5,46	
Localização	Orofaringe	1,00		0,151
	Boca	0,46	0,16-1,33	
Diferenciação	Bem diferenciado	1,00		0,569
	Moderadamente	1,37	0,46-4,10	
	Pouco diferenciado	65,58	3,75-1146,80	
Embolização sangüínea	Ausente	1,00		0,018
	Presente	4,84	1,30-17,94	
Embolização linfática	Ausente	1,00		0,057
	Presente	2,81	0,97-8,12	
Invasão perineural	Ausente	1,00		0,853
	Presente	1,11	0,37-3,31	
Infiltração inflamatória	Escasso	1,00		0,063
	Moderado	4,19	0,92-18,98	
	Intenso	1,55	0,14-17,07	
TNM categorizado	T1-T2	1,00		0,024
	T3-T4	3,71	1,19-11,58	
Linfonodo comprometido	Ausente	1,00		0,030
	Presente	3,51	1,13-10,88	
Invasão extracapsular	Ausente	1,00		0,202
	Presente	2,26	0,65-7,87	

A figura 13 apresenta a curva de sobrevida para o conjunto dos polimorfismos genéticos estudados TNF -308 e TNF -238. Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas entre as curvas de sobrevida para os

grupos TNF -308 G/G, TNF -238 G/A+A/A e TNF -308 G/A+A/A TNF -238 G/G
(teste log-rank; valor $p=0,4896$).

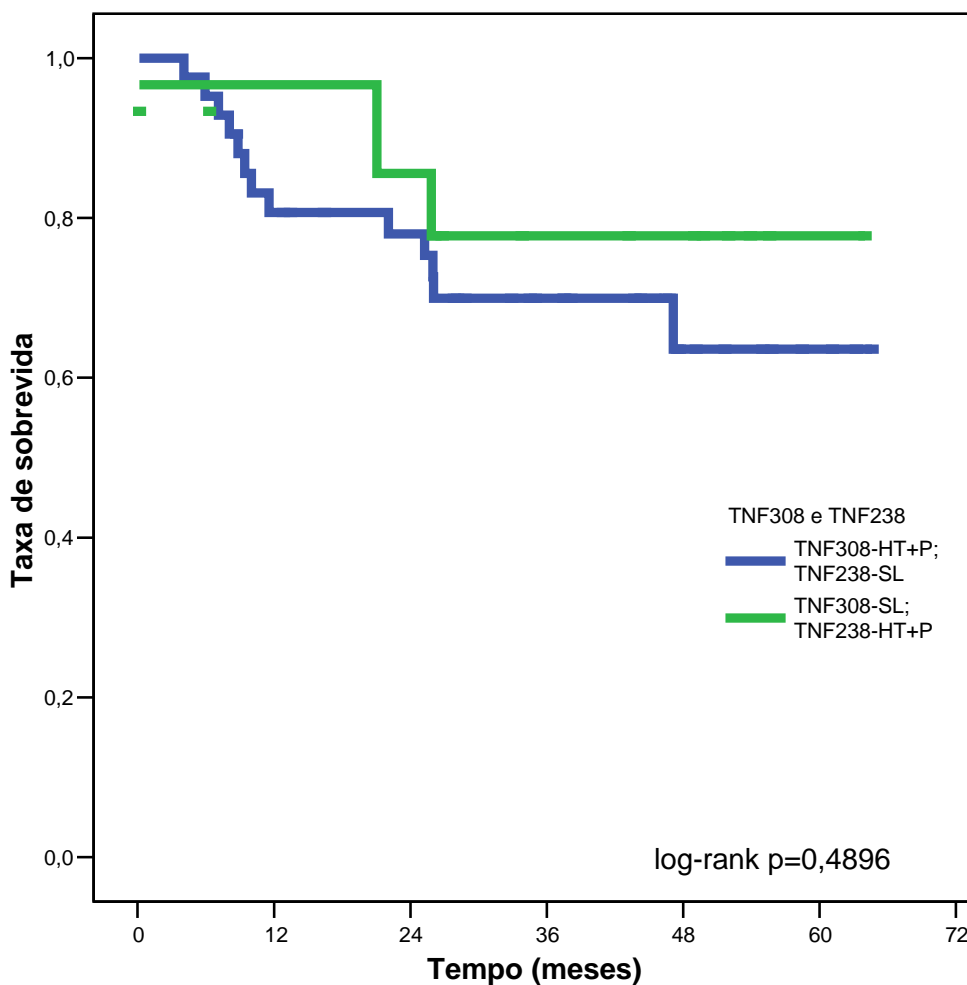


Figura 13. Curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos grupos de polimorfismos agrupados.

Para modelar o tempo de sobrevida específica pela doença, o modelo de regressão de Cox foi utilizado. Na tabela 17 consideramos as variáveis independentes encontradas na análise, assim como, a variável TNF -308/TNF -238 que foi incluída no modelo mesmo não sendo estatisticamente significativa.

Nessa tabela são apresentadas as variáveis independentes encontradas na construção do modelo múltiplo. Encontrou-se que os tumores pouco diferenciados, infiltração sanguínea, TNM avançado e linfonodo comprometido são fatores associados com a piora da sobrevida específica pela doença.

Tabela 17: Distribuição das razões de chance ajustada para a análise de sobrevida nos grupos de maior e menor risco.

Característica	Categoria	Hazard ratio não ajustado	Hazard ratio ajustado	Intervalo de confiança para	p
Diferenciação	Bem diferenciado	1,00	1,00		
	Moderadamente	1,37	0,38	0,07-2,21	0,282
	Pouco diferenciado	65,58	171,76	7,54-3910,17	0,001
Infiltração sangüínea	Ausente	1,00	1,00		
	Presente	4,84	7,17	1,54-33,48	0,012
TNM categorizado	T1-T2	1,00	1,00		
	T3-T4	3,71	8,16	1,78-37,40	0,007
Linfonodo comprometido	Ausente	1,00	1,00		
	Presente	3,51	13,89	1,84-104,83	0,011
TNF -308 / TNF -238	-308G/G; -238G/A+A/A	1,00	1,00		
	-308G/A+A/A; -238G/G	1,55	0,45	0,10-1,92	0,279

7 DISCUSSÃO

É estimado que a inflamação participe na etiologia de 15% dos tumores malignos. Na inflamação crônica os macrófagos desempenham um papel importante pela quantidade de bioprodutos liberados, entre eles encontramos enzimas como as colagenases, fatores de crescimento e citocinas, incluindo o TNF. O carcinoma de cabeça e pescoço se desenvolve em um ambiente de inflamação e a presença de células do infiltrado inflamatório é comum a essa neoplasia (Hohberger *et al*, 2008).

A proteína TNF- α está envolvida na promoção da resposta inflamatória e tem papel importante na patogênese da inflamação, doenças autoimunes e doenças malignas. Inicialmente foi estudada como droga antitumoral, mas estudos “in vitro” e “in vivo” demonstraram seu papel na promoção tumoral, sendo essencial na promoção da tumorigênese por agressores externos como o ácido ocadaico. O aumento do nível sérico da proteína TNF- α tem sido descrita em pacientes com tumores sólidos, incluindo o carcinoma de boca e orofaringe (Suganuma *et al.*, 1999; Azmy *et al.*, 2004).

O gene TNF- α é particularmente difícil de ser estudado isoladamente por fazer parte do complexo de histocompatibilidade maior, região de maior densidade genética de todo o genoma, com grande número de polimorfismos e onde encontramos sobreposição de genes.

Outra dificuldade encontrada é a baixa quantidade de alelos mutados, principalmente do polimorfismo -238. Mas essa incidência dos polimorfismos em nosso estudo foi equivalente a encontrada em outras populações (Liu *et al.*, 2005). Outro estudo realizado com esses polimorfismos na população brasileira, no estado do Rio de Janeiro, também encontrou poucos alelos mutados do polimorfismo -238 quando compara pacientes com e sem tuberculose, não encontrando nenhum homocigoto mutado entre os pacientes sem tuberculose (Oliveira *et al.*, 2004).

Nós estudamos um grupo de 188 pacientes com carcinoma epidermóide de boca e orofaringe e 235 controles, para relacionar o papel dos polimorfismos -308 e -238 do gene TNF- α como fatores de risco e de agressividade ao carcinoma epidermóide.

Nesta casuística, a maioria dos pacientes com carcinoma epidermóide de boca e orofaringe era composta por homens (84,57%), brancos (72,19%),

tabagistas (72,34%) e etilistas (55,85%), com idades entre 50 e 59 anos (35,64%). Estes dados estão de acordo com os relatos de outros autores que mostraram um predomínio da etnia branca e da quinta década de vida entre os pacientes com carcinoma de boca e orofaringe (Gibson *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006). Dedevis *et al.*, em 2004, trabalhando com casuística brasileira mostraram uma distribuição de faixa etária um pouco superior à observada nesse estudo (60 a 69 anos).

A baixa prevalência entre pacientes jovens pode estar relacionada ao tempo e intensidade da exposição a carcinógenos e susceptibilidade individual necessários para a tumorigênese (Gibbs *et al.*, 2003).

A primeira parte do nosso trabalho contemplou o estudo caso-controle e os fatores preditores do carcinoma de boca e orofaringe, para investigarmos a possibilidade dos polimorfismos na região promotora do gene TNF- α contribuírem para a susceptibilidade ao carcinoma de boca e orofaringe. Na literatura encontramos o polimorfismo -308 como um fator de maior susceptibilidade ao carcinoma de boca e orofaringe, devido a esse polimorfismo aumentar a transcrição do gene TNF- α , o que contribuirá para o desenvolvimento estromal necessário para o crescimento do tumor e sua disseminação, pois a proteína TNF- α estimula o crescimento dos fibroblastos, induz vários fatores angiogênicos e promove diretamente a proliferação celular endotelial (Leek *et al.*, 1998; Suganuma *et al.*, 1999; Balkwill *et al.*, 2002), além de induzir a expressão de colagenases que estão envolvidas no comportamento invasivo das células tumorais (Ioculano *et al.*, 1995; Parks *et al.*, 1994; Hohberger *et al.* 2008). Células com o alelo A na posição -308 podem produzir mais de 6 vezes a quantidade de RNA mensageiro do que as que possuem o alelo G nessa posição (Liu *et al.*; 2005).

O contrário acontece em relação ao polimorfismo -238, pois a sua mutação causará uma diminuição na transcrição do gene TNF- α , resultando em um efeito protetor contra os tumores pela diminuição da ocorrência dos eventos descritos acima.

Após a genotipagem dos pacientes e controles, não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre eles nos dois polimorfismos estudados. Diferente resultado encontrou Liu *et al.* (2005), que constatou significância na menor quantidade de pacientes com alelo -238A/G. Em nosso

estudo a quantidade de pacientes com alelo mutado também era menor no grupo de pacientes do que nos controles, mas sem significância estatística. Uma das diferenças entre nosso estudo e de Liu *et al.* foi o pareamento do grupo controle em relação a gênero e idade, o que pode ter contribuído para o resultado, pois esse polimorfismo é raramente encontrado na população taiwanesa, onde não foi encontrado nenhum paciente mutado nos dois alelos em um estudo com 146 pacientes, mas foi encontrado 1,1% em estudo com 220 indivíduos. Nas populações espanhola (n=102) e alemã (n=200) também não foram encontrados indivíduos com mutações nos dois alelos (Liu *et al.*, 2005).

Outro estudo realizado na população indiana (Gupta, *et al.*, 2008) não encontrou diferenças estatisticamente significantes em relação ao polimorfismo -238. Um ponto em comum dos três estudos foi a ausência de alelos homocigotos mutados entre os pacientes, o que sugere a função protetora desse alelo em relação ao carcinoma de boca e orofaringe.

Quando levamos em consideração o polimorfismo na região -308 do gene TNF- α , encontramos um maior número de pacientes com pelo menos um alelo mutado em relação aos controles. Em nosso estudo, essa relação não foi estatisticamente significativa, mas no estudo de Liu *et al.* (2005) ela teve significância. No estudo de Gupta *et al.* (2008) essa diferença só teve significância quando os alelos foram estudados separadamente, com uma maior frequência do alelo A nos pacientes. Quando levamos em consideração o genótipo dos pacientes (como em nosso estudo) encontramos uma maior quantidade de genótipos A/G e A/A entre os pacientes, mas sem significância estatística. Os resultados sugerem que o genótipo G/G pode conferir uma proteção contra o carcinoma de boca e orofaringe, pois teríamos como fenótipo uma menor quantidade de TNF- α produzida.

Na segunda parte do estudo avaliamos o impacto dos polimorfismos na sobrevivência dos pacientes. Pior prognóstico e resistência à terapia estão entre as características dos tumores que induzem uma maior quantidade de TNF- α (Romero-Reys *et al.*, 2007).

O TNF- α tem como característica a organização de microambientes, e a sua produção pode estimular a modelação tissular e as mudanças celulares (Balkwill, 2002). Essa citocina induz a expressão de genes pró-inflamatórios

que o tumor usa como promotor tumoral, entre esses genes expressos estão outras citocinas, fatores angiogênicos e MMPs, essas proteínas contribuem para o crescimento, invasão e metástase dos tumores (Waterson e Bower, 2004).

As células tumorais usam a proteína TNF- α para induzir moléculas envolvidas no processo metastático. Entre os eventos de metástase que o TNF- α está envolvido, temos a neovascularização e angiogênese, diminuição da adesão entre as células tumorais, aumento da mobilidade celular, invasão da matriz extra celular e aumento da permeabilidade na vascularização sanguínea e linfática, causando a entrada de células tumorais na circulação e sua disseminação pelo organismo (Waterson e Bower, 2004). O aumento do número de metástases ocasionada pela maior quantidade de TNF- α pode levar a uma diminuição da sobrevida desses pacientes.

A produção de TNF- α pelas células tumorais pode afetar profundamente o comportamento tumoral e afetar o estado clínico do paciente, pois o TNF- α está associado a caquexia e anemia causadas pelo tumor (Parks *et al.*, 1994). O aumento sérico dessa proteína está associado a uma redução na massa muscular e a outros fatores relacionados à caquexia, com aumento significativo da mortalidade em pacientes com câncer de próstata (Nakashima *et al.*, 1998).

O polimorfismo na posição -308 do gene TNF- α nos dois alelos foi associado a um maior risco de falha na primeira tentativa de quimioterapia e redução na sobrevida entre pacientes com linfoma (Warzocha *et al.*, 1997).

Esse polimorfismo também foi associado a uma maior presença de embolização vascular em pacientes com câncer de mama, o que poderia causar uma maior incidência de metástase e por consequência uma diminuição na sobrevida desses pacientes (Azmy *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, usamos a Regressão de Cox para traçarmos a curva de sobrevida dos pacientes em relação aos dois polimorfismos estudados.

Em relação ao polimorfismo -308, encontramos na literatura, a informação da diminuição da sobrevida dos pacientes que possuem o polimorfismo em câncer de próstata, leucemia e linfoma (Nakashima *et al.*, 1998, Adami *et al.*, 2004, Warzocha *et al.*, 1997).

Não encontramos na literatura nenhum artigo comparando a sobrevida dos pacientes, com ou sem os polimorfismos na posição -308 e -238 do gene TNF- α , em indivíduos com carcinoma de boca e orofaringe.

Apesar da Regressão de Cox não dar resultado significativo, podemos observar pela curva de sobrevida, que os pacientes com polimorfismo na posição -308 do TNF- α tem uma queda na sobrevida de maneira mais acentuada que os pacientes sem o polimorfismo. Esse fato apoia a hipótese de que o polimorfismo nessa região e consequente aumento na transcrição do TNF- α originado por ele, diminui a sobrevida desses pacientes, pois como já foi relatado, esse polimorfismo aumenta a quantidade de proteína circulante e uma maior quantidade de colagenases serão estimuladas, aumentando a motilidade e o comportamento invasivo e metastático das células tumorais (Iocolano *et al.*, 1995; Parks *et al.*, 1994; Hohberger *et al.*; 2008).

O contrário acontece com a curva de sobrevida dos pacientes levando em consideração o polimorfismo na posição -238, que tem uma queda menos acentuada na taxa de sobrevida, o que vai de encontro com a literatura, que relata um fator de proteção ao tumor e sua recorrência nos pacientes com esse polimorfismo. Mas essas diferenças não foram estatisticamente significantes.

Em uma terceira fase do nosso estudo associamos os dois polimorfismos estudados em dois novos grupos. No grupo 1 foram colocados os pacientes com o genótipo de menor risco para o desenvolvimento de câncer de boca e orofaringe, segundo o encontrado na literatura. Esse grupo foi constituído dos pacientes sem polimorfismo nos dois alelos na posição -308 e com mutação em pelo menos um alelo na posição -238. No segundo grupo colocamos os pacientes com pelo menos um alelo mutado na posição -308 e sem mutações na posição -238, esse grupo teria o genótipo de maior risco para o desenvolvimento do câncer pois, teoricamente, é o que produziria uma maior transcrição da citocina TNF- α .

O objetivo dessa nova análise foi relacionar os dois polimorfismos com a sobrevida ao carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.

Não encontramos na literatura nenhum trabalho semelhante, pois todos os trabalhos conhecidos levaram em conta os dois polimorfismos separadamente.

O grupo de menor risco era constituído de 15 pacientes e o de maior risco por 42 pacientes. O pequeno número da amostra foi uma das dificuldades encontradas para a análise estatística.

Primeiramente analisamos as características histopatológicas do tumor comparando os dois grupos.

Mesmo no grupo de menor risco com um genótipo onde seria esperado uma menor transcrição de TNF- α , o infiltrado inflamatório peritumoral foi encontrado em 12 pacientes desse grupo (92,3%), resultado muito semelhante ao encontrado no grupo de maior risco onde temos 37 (97,4%) pacientes com infiltrado inflamatório peritumoral presente.

Quando levamos em consideração a presença de linfonodos comprometidos, o grupo de menor risco possui apenas 4 pacientes (26,7%) nessa condição, enquanto que no grupo de maior risco há 23 (54,8%) dos pacientes com comprometimento linfonodal. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,061$), mas aumentando o tamanho da amostra isso poderia ser conseguido. O comprometimento linfonodal encontrado em maior quantidade nos pacientes que seriam maiores transcritores de TNF- α , pode ser justificado pelo aumento do comportamento invasivo-metastático que o TNF- α causa nas células tumorais.

Analisamos também os fatores prognósticos relacionados com a sobrevida dos pacientes. Na regressão de Cox univariada mostramos que os pacientes do grupo 2 teriam um risco maior de morte pelo tumor ($HR=1,55$) que não foi estatisticamente significativa. Isso seria justificado pela maior possibilidade de metástase esperada nos pacientes que transcrevem uma maior quantidade de TNF- α , que causaria uma sobrevida menor para esses pacientes. Quando analisamos a regressão de Cox múltipla, o número de *hazard ratio* se inverte para 0,45, mostrando que o polimorfismo do TNF- α não interfere no risco de morte pelo carcinoma de boca e orofaringe, e que, em nossa casuística, não se comprova que os polimorfismos do TNF- α estão envolvidos na sobrevida ao carcinoma, mesmo quando analisados em conjunto.

Apesar de não ser estatisticamente significativa, quando analisamos as curvas de sobrevida do grupo de baixo risco comparada com o de alto risco, percebemos que no grupo de alto risco há uma queda mais acentuada na

curva de sobrevida nos primeiros 12 meses de observação, com esse grupo apresentando uma taxa de sobrevida próxima a 80%, enquanto que no grupo de menor risco a taxa é próxima de 95%.

Podemos concluir que em nossa casuística não comprovamos os resultados encontrados na literatura, segundo a qual, um genótipo com polimorfismos que aumentam a transcrição de TNF- α , causariam um maior risco de morte para esse grupo de pacientes com a consequente queda na curva de sobrevida.

Os resultados encontrados confirmam o tabagismo e o etilismo como os principais fatores de risco ao carcinoma epidermóide de boca e orofaringe, enquanto que os polimorfismos na região promotora do gene TNF- α -308 e -238 ,isoladamente, não participam de forma significativa na gênese e sobrevida dos pacientes a esse carcinoma.

8 CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados observados nesse estudo com 188 pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca e orofaringe, podemos concluir que:

- Os polimorfismos -238 e -308 do gene TNF- α não estão relacionados ao risco de carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.
- Os polimorfismos -238 e -308 do gene TNF- α não estão relacionados a diferenças no tempo de sobrevida ao carcinoma de boca e orofaringe.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham LJ, Kroeger KM. Impact of the -308 TNF promoter polymorphism on the transcriptional regulation of the TNF gene: relevance to disease. *J Leukocyte Biol*; 66:562-6, 1999.

Azmi IAF, Balasubramanian S P, Wilson AG, Stephenson TJ, Cox A, Brown NJ et al. Role of tumor necrosis factor gene polymorphisms (-308 and -238) in breast cancer susceptibility and severity. *Breast Cancer Res*; 6(4):395-400, 2004.

Balkwill F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor*; 13: 135-41, 2002.

Briskin K B, Fady C, Wang M, Lichtenstein A. Apoptotic inhibition of head and neck squamous cell carcinoma cells by tumor necrosis factor α . *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*; 122:559-63, 1996.

Cavaleiro J, Fonseca JE. Gene do TNF α e artrite reumatóide: prognóstico e farmacogenética. Onde estamos e para onde vamos? *Acta Reum. Port.*; 29: 233-42, 2004.

Chouchane L, Ahmed SB, Baccouche S, Remadi S. Polymorphism in the tumor necrosis factor- α promotor region and in the heat shock protein 70 genes associated with malignant tumors. *Cancer*; 80(8):1489-96, 1997.

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

Falkensammer C, Johrer K, Gander H, Ramoner R, Putz T, Rahm A, Greil R, Bartsch G, Turnher M. Il-4 inhibits the TNF-alpha induced proliferation of renal cell carcinoma (RCC) and cooperates with TNF-alpha induced apoptotic and cytokine responses by RCC: implications for antitumor immune responses. Cancer Immunol, Immunotherapy; 28:1-10, 2006.

Gorouhi F, Islami F, Bahrami H, Kamangar F. Tumour-necrosis factor-A polymorphisms and gastric cancer risk: a meta – analysis. BJ Cancer; 98: 1443-51, 2008.

Gupta R, Sharma SC, Das SN. Association of TNF- α and TNFR1 promoters and 3'UTR region of TNFR2 gene polymorphisms with genetic susceptibility to tobacco-related oral carcinoma in Asian Indians. Oral Oncol; 44: 455-63, 2008.

Hoffmann TK, Grzegorz D, Tsukihito T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. Clinical Cancer Res; 8: 2553- 62, 2002.

Hohberger L, Wuertz BRK, Xie H, Griffin T. TNF- α drives matrix metalloproteinase-9 in squamous oral carcinogenesis. Laryngoscope;118: 1395-99, 2008.

Huang SL, Su CH, Chang SC. Tumor necrosis factor- α gene polymorphism in chronic bronchitis. Am J Respir Care Med; 156:1436-39, 1997.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/2007>. 2007

Iocolano M, Altavilla D, Squadrito F, Canale P, Squadrito G, Saitta A et al. Tumour necrosis factor mediates E-selectin production and leukocyte accumulation in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res*; 31:281-88, 1995.

Jacob CO, Fronck Z, Lewis GD, Koo M, Hansen J A, McDevitt HO. Heritable major histocompatibility complex class II-associated differences in production of tumor necrosis factor alpha: relevance to genetic predisposition to systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 87(3):1233-7, 1990.

Jang WH, Yang YI, Yea SS, Lee YJ, Chun JH, Kim MS et al. The -238 tumor necrosis factor-alpha promoter polymorphism is associated with decreased susceptibility to cancers. *Cancer Lett*; 166:41-46, 2001.

Kamali-Sarvestani E, Zolghadri J, Ghareh-Sardi B, Sarvari J. Cytokine gene polymorphisms and susceptibility to recurrent pregnancy loss in Iranian women. *J Reprod Immunol*; 65 (2):171-8, 2005.

Kassouf N, Tornhill MH. Oral cancer cell lines can use multiple ligands, including Fas -L, TRAIL and TNF- α , to induce apoptosis in Jurkat T cells: Possible mechanisms for immune escape by head and neck cancers. *Oral Oncol*; 44: 672-82, 2008.

Leek RD, Landers R, Fox S B, Ng F, Harris A L, Lewis CE. Association of tumour necrosis factor alpha and its receptors with thymidine phosphorylase expression in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer*; 77(12):2246-51, 1998.

Li H, Groop L, Nilsson A, Weng J, Tuomi T. A combination of human leukocyte antigen DQB1*02 and the tumor necrosis factor α promoter G308A polymorphism predisposes to insulin-deficient phenotype in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*; 88(6): 2767-74, 2003.

Liu C, Wong Y, Chang K, Chang H, Liu H, Lee Y. Tumor necrosis factor- α promoter polymorphism is associated with susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*; 34: 608–12, 2005.

Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S et al. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- α production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol*; 113:401-6, 1998.

Macarthur M, Hold GL, El-Omar EM. Inflammation and cancer II. Role of chronic inflammation and cytokine gene polymorphisms in the pathogenesis of gastrointestinal malignancy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 286: 515-20, 2004.

Mathias C, Harréus U, Strange R. Influential factors on tumor recurrence in head and neck cancer patients. *Eur Arch Otorrinolaringol*; 263: 37-42, 2006.

McCarthy M; Poses, RM; Saghatchian, M; de Pouvourville, G; Tursz, T; Gray, A. Cancer funding throughout the world. *Lancet Oncol*; 5(7):453-7, 2004.

McGuire W, Hill V, Allsoop CE, Greenwood BM, Kwiatkowski D. Variation in the TNF alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. *Nature*; 371:508-10, 1994.

NCBI (National Institutes of Biotechnology Information. National Library of Medicine. National Institutes of Health). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/2005>. 2005.

Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Nedwin JJ, Pennica D, Goeddel D V, Gray PW. Human Lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res*;11;13(17):6361-73, 1985.

Oliveira MM, Silva JCS, Costa JF; Amim LH; Loredó CCS; Melo H et al. Distribuição de polimorfismos de base única (SNPs) no gene de TNF- α (-238/-308) entre pacientes com TB e outras pneumopatias: marcadores genéticos de suscetibilidade a ocorrência de TB? J Bras Pneumol; 30(4), 2004.

Ozen S, Alikasifoglu M, Bakkaloglu A, Duzova A, Jarosova K, Nemcova D. et al. Tumour necrosis factor α G \rightarrow A -238 and G \rightarrow A -308 polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis. Rheumatology; 41:223-7, 2002.

Parks RR, Yan S, Huang C. Tumor necrosis factor- α production in human head and neck squamous cell carcinoma. Laryngoscope; 104: 860-4, 1994.

Patinõ-Garcia A, Sotillo-Piñeiro E, Modesto C, Sierrasesúmaga L. Analysis of the human tumor necrosis factor- α (TNF- α) gene promoter polymorphism in children with bone cancer. J Med Genet; 37: 789-92, 2000.

Romero-Reyes M, Head C, Cacalano NA, Jewett A. Potent induction of TNF- α during interaction of immune effectors with oral tumors as a potential mechanism for the loss of NK cell viability and function. Apoptosis; 12: 2063-75, 2007.

Suganuma M, Okabe S, Marino MW, Sakai A, Suoka E, Fujiki H. Essential role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α - deficient mice. Cancer Res; 59: 4516-18, 1999.

Sandra F, Matsuki N, Takeushi H, Ikebe T, Kanematsu T, Ohishi M, et al. TNF inhibited the apoptosis by activation of Akt serine/threonine kinase in the human head and neck squamous cell carcinoma. Cellular Signaling; 14: 771-8, 2002.

Shirai T, Yamaguchi H, Ito C, Todd CW, Wallace RB. Cloning and expression in

Escherichia coli of the gene for human tumor necrosis factor. Nature; 313: 803-6, 1985.

Skoog T, Van't Hoof FM, Kallin B, et al. A common functional polymorphism (C → A) substitution at position -863 in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha (TNF- alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. Hum Mol Gen; 8 : 1443-9, 1999.

Soylu L, Ozcan C, Ceik F, Paydas S, Kiroglu M, Aydogan B et al. Serum levels of tumor necrosis factor in squamous cell carcinoma of the head and neck. Am J Otolaryngol; 15 : 281-5, 1994.

Su TR, Chang KL, Lee CH, Chen CH, Yang YH, Shie TY. Expression of tumor factor-alpha and its soluble receptors in betel-quid-chewing patients at different stages of treatment for oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol; 40: 804-10, 2004.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor α promoter on transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA; 94(7):3195-9, 1997.

Yang JJ, Kwang-Pil K, Cho LY, Shin A, Gwack J, Chang SH, Shin HR, Yoo KY, Kang D, Park SK. The role of TNF genetic variants and the interaction with cigarette smoking for gastric cancer risk: a nested case-control study. BMC Cancer; 9 (238), 2009.



UGA I – UNIDADE DE GESTÃO ASSISTENCIAL – HOSPITAL HELIÓPOLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 10 de Junho de 2008.

APROVAÇÃO

A Prezada


Dra. Denise Nahas Matin Gaspar

Vimos por meio desta informar que o projeto de pesquisa: “**Caracterização clínica e epidemiológica e avaliação dos polimorfismos - 238 e -308 do gene tnf-a em pacientes com carcinoma epidermóide de boca e orofaringe**” e seus demais documentos, registrado neste CEP sob nº 620, tendo como relator o Dr. Juvêncio José Duailibe Furtado, foi aprovado por este Comitê de Ética em pesquisa em: 10/06/2008.

Lembramos que é obrigatório o envio de relatório anual e final para este Comitê de Ética em Pesquisa.

Atenciosamente,

COMITE DE ETICA EM PESQUISA
HOSPITAL HELIÓPOLIS
Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
Coordenador



Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
COORDENADOR

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](#)