

CAROLINA CAVALIÉRI GOMES

VARIANTES DO P21/WAF1 E DA CICLINA D1  
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS  
DE BOCA

BELO HORIZONTE

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UFMG

2007

“A grande tragédia da ciência: o assassinato de uma  
linda hipótese por um fato horroroso.”

Thomas Henry Huxley

“Uma acumulação de fatos não é uma ciência, da  
mesma forma que uma porção de pedras não é uma  
muralha.”

Henri Poincaré

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu marido, Ricardo.

Aos meus pais, Carla e Mateus.

Aos meus irmãos Marina e Juliano.

Aos meus sogros, Terezinha e Marcus Vinicius.

A todos os meus familiares e amigos.

Pelo amor, pelas palavras de incentivo e pela presença em todos os momentos.

“A grande tragédia da ciência: o assassinato de uma  
linda hipótese por um fato horroroso.”

Thomas Henry Huxley

“Uma acumulação de fatos não é uma ciência, da  
mesma forma que uma porção de pedras não é uma  
muralha.”

Henri Poincaré

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao professor Ricardo Alves de Mesquita, por ter me acolhido como orientanda.

Ao professor Ricardo Santiago Gomez. Pelo empenho em aprimorar cada detalhe deste trabalho. Pelo esforço em fazer do Laboratório de Biologia Molecular o melhor local para se trabalhar, seja pelo clima de amizade, seja pela preocupação em não deixar faltar nenhum material. Acima de tudo, pelo exemplo de ética e conduta profissional que representa para mim.

A cada um dos professores que fizeram parte de minha trajetória no mestrado.

Aos colegas da Patologia, em especial aos colegas de laboratório André Luiz, Eliza Carla, Flávio Juliano, Guilherme, Jeane, Luciano Marques, Marina Diniz e Sérgio Neves, e à minha dupla Vanessa. Por todos os agradáveis momentos que passamos juntos e pela inestimável ajuda.

Aos alunos de iniciação científica Carlos, Anna Lucia, Gustavo e Joanna, que me acompanharam durante este período.

Aos pacientes, que gentilmente concordaram em participar desta pesquisa.

A cada um que tenha participação direta ou indireta em minha formação de Mestre.



31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

## **Acknowledgements**

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil. Dr. RA Mesquita and RS Gomez are research fellows of CNPq.

Total number counts:

Authors: 6 authors

Text file: 2937 words

Tables: 4

Permissions accompanying the cover letter: 0

## Abstract

45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67

Background: Genetic factors are known to be involved in oral squamous cell carcinoma (OSCC) development.

Methods: We evaluated a possible association between CCND1 A870G and P21 C98A polymorphisms and OSCC, as well as the impact of the genotypes on protein immunoeexpression. The study group consisted of 80 individuals with histopathological diagnosis of OSCC and the control group consisted of 80 healthy individuals without oral lesions and matched by age, sex and tobacco usage. The genotypes were studied by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Paraffin-embedded sections were used for immunohistochemical analysis.

Results: No statistical association between CCND1 and/or P21 genotypes and OSCC was demonstrated, although we found that people harbouring the combined presence of at least one variant allele of both genes showed a 1.8 times more chance of developing OSCC compared to the referent genotype. OSCC tumors from individuals with P21 heterozygous genotype showed a significantly higher immunopositivity than tumours from wild-type individuals.

Conclusions: The present study did not demonstrate a significant association between CCND1 and/or P21/WAF1 genotypes and OSCC. However, P21 protein expression in OSCC tumors is affected by P21/WAF1 genotype.

Keywords: oral cancer; oral squamous cell carcinoma; cell cycle; p21; cyclin d1; polymorphism; protein expression; immunohistochemistry; protein expression; CCND1; P21/WAF1; susceptibility; genetics; PCR; RFLP.

## Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most frequent cancers in the world and its main risk factors are smoking and alcohol consumption. This condition is known to develop without these risk factors, which suggests the importance of host factors [1]. OSCC results from multiple genetic events, resulting in damage to signalling pathways and to the regulation of cell cycle. Cell cycle checkpoints are important to genetic integrity and aberrant cell cycle control can allow tumor growth. Therefore, polymorphisms of genes involved in these pathogenic pathways are candidates for investigations of genetic susceptibility and may become a biomarker for screening the high-risk population for increased predisposition to cancer [2].

Cyclin D1 (CCND1) is a key regulatory protein in the transition from G1-S phase of the cell cycle [3]. The single base pair polymorphism G870A in CCND1 is characterized by a G to A substitution, and although it does not lead to an amino acid change, the variant nucleotide increases the frequency of alternative splicing [4]. The carboxyl-terminal end of the alternative transcript lacks sequences important for protein turn-over and possibly leads to a longer half-life [4].

p21 (P21/WAF1) is a CDK (cyclin-dependent kinase) inhibitor protein essential for cellular growth, differentiation and apoptosis [5]. p21 introduction reduces the growth of cancer in animal models [6]. The expression of p21 itself is up regulated by p53 in response to DNA damage, leading to either cell cycle arrest, at the G1 checkpoint, or apoptosis [5]. p21/WAF1 C98A polymorphism is found in exon 2, leading to a cytosine-to-adenine change which results in a serine-to-arginine substitution at codon 31 [7]. Although there is no published data about any functional relevance of this polymorphism and the mechanism by which it might affect cancer risk, it has been shown to cause a serine-to-arginine substitution in its DNA-binding zinc-finger domain, which could alter the protein's function [8].

Since no one has investigated the effects of P21/WAF1 C98A polymorphism on OSCC the purpose of this study was to investigate a possible association between this variant together with CCND1 G870A polymorphisms and the risk of developing OSCC in a Brazilian population, assessing as well the immunoexpression of p21 and cyclin D1 proteins in cases of OSCC carrying the wild-type and polymorphic genotypes.

## Materials and Methods

### Subjects and sample collection

The study group consisted of 80 individuals with histopathological diagnosis of OSCC (mean age 57.5yrs; range 39-82) and the control group consisted of 80 healthy individuals (mean age 53.5; range 39-85) without oral lesions and matched by age, sex and tobacco usage. The individuals were recruited from the Dental Clinics at the Dentistry School of Universidade Federal de Minas Gerais and from a local hospital. All subjects were unrelated and none of them had undergone chemotherapy or radiotherapy. Both groups lived in the same geographic area and presented the same socio-economic status. The individuals were not stratified in ethnic groups based on skin color, race, and geographic origin due to the strong miscegenation among Brazilians [9]. Regarding tobacco consumption, individuals were classified as smokers or non-smokers. Ex-smokers who had not smoked for more than 2 years were considered non-smokers [10]. Oral mucosa swabs were obtained from all subjects and stored at -20°C until processing. DNA isolation was carried out as described by Boom et al [11]. All samples from the patients with carcinoma were obtained from the lesion's contra-lateral mucosa. This study was approved by the appropriate ethics committee and a signed informed consent was obtained from all the participants.

### Determination of genotypes

The genotypes were studied by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. At least 10% of the random samples for both genes were retested and the results were 100% concordant.

### Determination of P21/WAF1 genotypes

PCR amplification was performed using primers previously described [12]. PCR conditions were approximately 100-300 ng of DNA template, primers (4pmol/reaction), 1.25 units/reaction of Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil), 2.5 µl 10x PCR buffer (Invitrogen, Brazil), 0.6µl of 50 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, Brazil), 2 µl of each DNTP (100 µmolar), in a 25µl final volume in a Master-cycler gradient thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The amplification conditions consisted of an initial denaturing step at 94C for 5 min followed by 35 cycles of amplification at 94C for 30s, 67C for 40s and 72C for 45s, followed by a final

125 elongation at 72C for 10min. Each PCR amplification was analyzed in a 6.5% polyacrylamide  
126 gel electrophoresis followed by silver stain and a 273bp PCR fragment was obtained .PCR  
127 products were digested with the restriction enzyme BsmAI (New England Biolabs, Beverly,MA)  
128 (5U/reaction). The serine allele with a single BsmAI site gave two common fragments of 142  
129 and 131 bp. The arginine allele was detected by the presence of a second BsmAI site within the  
130 142 bp fragment, which generated 75 and 67 bp fragments.

### 131 **Determination of CCDN1 genotypes**

132 PCR amplification was carried out using primers previously described [4]. The reaction  
133 conditions were 100-300ng of DNA template, 20 pmol primer /reaction, 1.25 units/reaction of  
134 Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brazil), 2.5 µl 10x PCR buffer (Invitrogen, Brazil), 1.25µl  
135 50 mM magnesium chloride (Invitrogen, Brazil), 2.5 µl of each DNTP (100 µmolar) in a 25µl  
136 final volume in a Master-cycler gradient thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).  
137 Amplification was carried out as follows: an initial denaturing step at 95C for 10min followed by  
138 34 cycles of amplification at 94C for 30s, 55C for 30s and 72C for 1min, followed by a final  
139 elongation at 72C for 5min. Each PCR amplification was analyzed in a 6.5% polyacrylamide gel  
140 and PCR products were digested with the restriction enzyme *ScrFI* (New England Biolabs,  
141 Beverly, MA) (5U/reaction). The 167 bp PCR fragment was split into 146 and 22bp fragments  
142 when the *ScrFI* site was present. When the restriction site was present the genotype was  
143 designated G and when it was absent it was designated A [4].

### 144 **Immunohistochemistry**

145 Immunohistochemistry was performed in 24 OSCC cases: 06 with the wild type genotype  
146 of each gene, 06 presenting the homozygous polymorphic genotype of CCND1 and 06 with the  
147 heterozygous polymorphic genotype of P21/WAF1 (due to the fact that only one case had the  
148 homozygous polymorphic genotype of P21/WAF1). Paraffin-embedded of 4µm sections were  
149 dewaxed in xylene and hydrated with graded ethanol. Heat-induced retrieval was performed  
150 with 10 Mm citrate buffer pH 6.0 for 30 min in a steamer at 96C. After antigen retrieval,  
151 endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min. The sections were  
152 incubated with the primary monoclonal antibody to WAF1 (Novocastra, Newcastle-upon-Tyne,  
153 UK) in a 1:50 dilution and to cyclin D1 (Dako Corporation, Carpinteria, USA) in a 1:100

154 dilution, both overnight at 4<sup>0</sup>C. Immunohistochemical stains were performed using the high  
155 sensitive polymer-based system (EnVision, Dako Corporation, Carpinteria, USA) with  
156 Diaminobenzidine substrate solution as chromogen (Sigma, St Louis, USA). Sections were  
157 counterstained with haematoxylin, dehydrated and mounted. Two experienced independent  
158 pathologists examined 8 fields and scored tissue section by the percentage of nuclear staining,  
159 regardless of staining intensity. More than 800 cells were counted in each section.

### 160 **Statistical analysis**

161 As suggested in the literature for case-control studies [13], we performed initially an  
162 adjusted chi-square test. We also performed univariate analysis with chi-square test using BioStat  
163 4.0 software (Optical Digital Optical Technology, Belém, Brazil). To investigate the influence of  
164 the polymorphisms on the risk of OSCC, as well as the influence of the combination of the two  
165 genes genotypes on the risk of OSCC, binary logistic regression models were fitted. The  
166 associations were expressed by odd ratios (ORs) and adjusted for age (< 55 and ≥ 55 yrs) and  
167 gender, with the corresponding 95% confidence intervals (CIs). *P*- values ≤0.05 were considered  
168 significant. The multivariate analysis was assessed using SPSS (SPSS Inc., Chicago), version  
169 14.0. The immunohistochemistry results analysis was performed with Mann-Whitney test using  
170 BioStat 4.0.

171

172

## **Results**

173 Table 1 summarizes the clinical data of the cases and controls. We did not find  
174 association between the P21/WAF1 genotypes or the CCND1 genotypes and OSCC in the  
175 univariate and multivariate models adjusted for gender and age (Table 2 and Table 3). In addition  
176 to this, the analysis combining both genes genotypes did not show statistical association between  
177 each of the possible combinations and OSSC development (Table 3).

178 Table 4 summarizes the immunohistochemistry results. Considering the expression of  
179 cyclin D1 in the tumors, no statistical difference was found between the immunoexpression in  
180 OSCC of wild-type *versus* polymorphic individuals. On the other hand, tumors from individuals  
181 with P21/WAF1 heterozygous genotype (CA) showed a higher immunopositivity than tumors  
182 from wild-type (CC) individuals (p=0.03).

183

## Discussion

184

185

186

187

188

189

190

191

192

The present study analyzed a possible association between the P21/WAF1 C98A and CCND1 G870A polymorphisms and the risk of developing OSCC. Elevated cyclin D1 levels might allow cells to escape from the cell cycle checkpoint control. So, it is suggested that DNA damage in cells from subjects with the variant allele (A) may bypass the G1/S checkpoint more easily than not carrying the variant, because the A allele enhances alternative gene splicing, leading to a protein with a longer half-life [4]. Although we expected to find a higher frequency of AA genotype in the case group when compared to the control group, we did not find an association between the CCND1 genotypes and OSCC development neither in the univariate nor in the multivariate model adjusted for age and gender.

193

194

195

196

197

198

The role of CCND1 genotypes and head and neck cancers is contradictory. While one group found similar genotype frequencies in individuals with OSCC and the control group [14], another study showed that subjects with the AA genotype had a higher risk of developing SCCHN [15]. On the other hand, another study found an association between the GG genotype and an increased susceptibility to OSCC [16]. Geographic location and the limited number of samples may be factors that influence such differences.

199

200

201

202

203

204

205

Regarding the immunohistochemistry findings, we expected to find a higher immunopositivity in the variant genotype cases, but the expression of cyclin D1 protein in the tumors with the polymorphic genotype did not differ from the wild-type tumors. A previous investigation of this polymorphism in individuals with oesophageal adenocarcinoma did not find genotype-dependent expression of cyclin D1 protein, confirming our findings [17]. However, another study showed that SCCHN from patients with the GG genotype presented a lower immunoexpression of cyclin D1 than those from patients with the AA or AG genotypes [16].

206

207

208

209

210

211

212

213

To our knowledge, our study is the first to investigate the codon31 polymorphism in OSCC. While a previous study investigated the codon 149 polymorphism in OSCC, another studied the codon 31 polymorphism in patients with SCCHN [2, 18]. The C98A polymorphism in P21/WAF1 gene resides in an area that is thought to encode a DNA-binding zinc-finger domain [8], leading to a possible production of a functionally distinct protein. We observed in the multivariate analysis that people carrying the variant allele (genotypes CA and AA) had a small increase in the chance of developing OSCC (OR 1.57), although in the univariate and multivariate models this association was not statistically significant. Although other studies have described an association between the

214 P21/WAF polymorphism and cancer development [18-20], it must be remembered that there are  
215 distinct differences in the P21/WAF1 gene among major ethnic groups [21].

216 Tumors from individuals with P21/WAF1 heterozygous genotype (CA) showed a  
217 significantly higher immunopositivity than tumors from wild-type (CC) individuals ( $p=0.03$ ). As  
218 we found only one case with homozygote variant genotype (AA), the comparison between the  
219 two homozygote genotypes was not possible. Our finding demonstrates that the heterozygous  
220 genotype is associated with increased protein expression, confirming a previous study in patients  
221 with endometrial carcinoma [22]. On the other hand, these authors did not find an association  
222 between genotype and protein expression in patients with breast and ovarian carcinomas [22].  
223 Another study that analyzed the levels of mRNA of p21 in patients with lung cancer concluded  
224 that people with the variant genotypes in case and control groups had a decrease in the mRNA  
225 levels when compared to people with CC genotype [23]. Taking this evidence together, we  
226 conclude that a tissue-specific expression pattern of P21/WAF1 in different tumors appears to be  
227 characteristic for each tumor type [22]. As the P21/WAF1 C98A variant genotypes investigated  
228 are in strong linkage disequilibrium with C70T variants of P21/WAF1 [12], we cannot establish  
229 which of these variants cause increased protein expression.

230 A previous study demonstrated a significant association between p21 over-expression and  
231 poor prognosis of OSCC, and also a decreased 2-year survival ( $p=0.01$ ) [24]. On this basis, we  
232 can suggest that individuals presenting the CA genotype may have a poorer prognosis than those  
233 presenting the CC genotype, and may also present a decreased survival. Further population-based  
234 studies analyzing the correlation between genotypes and long-term survival are necessary to  
235 elucidate this association.

236 When we analyzed the influence of the occurrence of both CCND1 and P21/WAF1  
237 genotypes together and OSCC, we found that people harbouring the combined presence of at least  
238 one variant allele of both genes showed a 1.8 times more chance of developing OSCC compared  
239 to the referent genotype. However, this association was not statistically significant ( $p=0.33$ ).

240 In conclusion, the present study did not demonstrate a significant association between  
241 CCND1 and/or P21/WAF1 genotypes and OSCC. However, tumors from individuals with  
242 P21/WAF1 heterozygous genotype showed a higher immunopositivity than tumors from wild-  
243 type genotype individuals, demonstrating that P21 protein expression in OSCC is affected by  
244 P21/WAF1 genotype.

245

246

## References

- 247 [1] Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell  
248 carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 2000; 36(4): 311-27.
- 249 [2] Ralhan R, Agarwal S, Mathur M, Wasylyk B, Srivastava A. Association between  
250 polymorphism in p21 (Waf1/Cip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene and human oral  
251 cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(6):2440-7.
- 252 [3] Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* 1995; 20(5):187-90.
- 253 [4] Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. Alternate  
254 splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 1995; 11(5):1005-11.
- 255 [5] Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal  
256 inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366(6456): 701-4.
- 257 [6] Cardinali M, Jakus J, Shah S, Ensley JF, Robbins KC, Yeudall WA. p21 (WAF1/Cip1)  
258 retards the growth of human squamous cell carcinomas in vivo. *Oral Oncol* 1998; 34(3):  
259 211-8.
- 260 [7] Chedid M, Michieli P, Lengel C, Huppi K, Givol D. A single nucleotide substitution at  
261 codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-  
262 inducible gene WAF1/CIP1. *Oncogene* 1994; 9(10): 3021-4.
- 263 [8] el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a  
264 potential mediator of p53 tumour suppression. *Cell* 1993; 75(4): 817-25.
- 265 [9] Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and  
266 genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(1): 177-82.
- 267 [10] Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez GC, Gonzalez-Navarro A, Cerero-Lapiedra R,  
268 Gonzalez-Hernandez MJ, Dominguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco  
269 smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral*  
270 *Oncol* 2000; 36(2):170-4.
- 271 [11] Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J.  
272 Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28(3):  
273 495-503.
- 274 [12] Mousset S, Ozcelik H, Lee PD, Malkin D, Bull SB, Andrulis IL. Two variants of the  
275 CIP1/WAF1 gene occur together and are associated with human cancer. *Hum Mol Genet*  
276 1995; 4(6):1089-92.
- 277 [13] Zou GY, Donner A. The merits of testing Hardy-Weinberg equilibrium in the analysis of  
278 unmatched case-control data: a cautionary note. *Ann Hum Genet* 2006; 70(6): 923-33.
- 279 [14] Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T, Kannan S. Influence of single nucleotide  
280 polymorphisms in H-Ras and cyclin D1 genes on oral cancer susceptibility. *Oral Oncol*  
281 2006; 42(6):607-13.

- 282 [15] Zheng Y, Shen H, Sturgis EM, Wang LE, Eicher SA, Strom SS, et al. Cyclin D1 polymorphism  
283 and risk for squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Carcinogenesis*  
284 2001; 22(8):1195-9.
- 285 [16] Holley SL, Matthias C, Jahnke V, Fryer AA, Strange RC, Hoban PR. Association of cyclin  
286 D1 polymorphism with increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*  
287 2005; 41(2): 156-60.
- 288 [17] Casson AG, Zheng Z, Evans SC, Geldenhuys L, van Zanten SV, Veugelers PJ, et al. Cyclin  
289 D1 polymorphism (G870A) and risk for esophageal adenocarcinoma. *Cancer* 2005; 104(4):  
290 730-9.
- 291 [18] Li G, Liu Z, Sturgis EM, Shi Q, Chamberlain RM, Spitz MR, et al. Genetic polymorphisms  
292 of p21 are associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck.  
293 *Carcinogenesis* 2005; 26(9): 1596-602.
- 294 [19] Wu MT, Wu DC, Hsu HK, Kao EL, Yang CH, Lee JM. Association between p21 codon 31  
295 polymorphism and esophageal cancer risk in a Taiwanese population. *Cancer Lett* 2003;  
296 201(2): 175-80.
- 297 [20] Roh JW, Kim JW, Park NH, Song YS, Park IA, Park SY, et al. p53 and p21 genetic  
298 polymorphisms and susceptibility to endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2004; 93(2): 499-505.
- 299 [21] Birgander R, Sjalander A, Saha N, Spitsyn V, Beckman L, Beckman G. The codon 31  
300 polymorphism of the p53-inducible gene p21 shows distinct differences between major  
301 ethnic groups. *Hum Hered* 1996; 46(3):148-54.
- 302 [22] Lukas J, Groshen S, Saffari B, Niu N, Reles A, Wen WH, et al. WAF1/Cip1 gene  
303 polymorphism and expression in carcinomas of the breast, ovary and endometrium. *Am J*  
304 *Pathol* 1997; 150(1): 167-75.
- 305 [23] Su L, Sai Y, Fan R, Thurston SW, Miller DP, Zhou W, et al. P53 (codon 72) and P21  
306 (codon 31) polymorphisms alter in vivo mRNA expression of p21. *Lung Cancer* 2003;  
307 40(3):259-66.
- 308 [24] Nemes JA, Nemes Z, Marton IJ. p21 WAF1/CIP1 expression is a marker of poor prognosis  
309 in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(5): 274-9.

310

311

**TABLE 1**

312

**Case group (OSCC) and control group clinical data**

313

<b>Characteristics</b>	<b>Case group (values)</b>	<b>Control group (values)</b>
<b>Age</b>		
Mean age	57.5	53.5
Range	39-82	39-85
<b>Gender</b>		
Male, n (%)	60 (75)	59 (73.75)
Female, n (%)	20 (25)	21 (26.25)
<b>Smokers</b>		
Yes, n (%)	70 (87.5)	70 (87.5)
No, n (%)	10 (12.5)	10 (12.5)

314

315

**TABLE 2**

316

**Genotype distribution in patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and control**

317

**subjects using univariate analysis.**

<b>Genotypes</b>	<b>OSCC (n=80)</b>	<b>Control (n=80)</b>	<b>P-value*</b>	<b>P-value**</b>
<b>CCND1 G870A (n, %)</b>				
GG	25 (31.25)	27 (33.75)		
GA	30 (37.50)	29 (36.25)		
AA	25 (31.25)	24 (30.00)	0.94	0.76
<b>P21 C98A (n, %)</b>				
CC	49 (61.25)	56 (70)		
CA	30 (37.50)	24 (30)		
AA	1 ( 1.25)	0 (0)	0.34	0.19
CA + AA	31 (38.75)	24 (30)	0.32	

318

319

320 \*P-values from Chi-square test. *P*- values  $\leq 0.05$  were considered significant.321 \*\*P-values from adjusted chi-square test. P-values  $\leq 0.05$  were considered significant.

322

323

**TABLE 3**

324

**Genotype frequencies and risk for oral squamous cell carcinoma (OSCC) analyzing the**

325

**genes separately and combined.**

Gene genotypes	OSCC (n=80)		Control (n=80)		OR <sup>a</sup>	95,0% C.I. <sup>a</sup>		P- value
	n	%	n	%		Lower	Upper	
<b><i>CCND1 (G870A)</i></b>								
GG	25	31.25	28	35.00	Referent			
GA	30	37.50	29	36.25	1.18	0.56	2.48	0.66
AA	25	31.25	23	28.75	1.20	0.55	2.63	0.65
<b><i>P21 (C98A)</i></b>								
CC	49	61.25	57	71.25	Referent			
CA + AA	31	38.75	23	28.75	1.57	0.81	3.04	0.18
<b><i>CCND1(G870A)+P21(C98A)</i></b>								
GG + CC	16	20.00	19	23.75	Referent			
GA + CC	19	23.75	22	27.50	0.99	0.38	2.54	0,98
AA+ CC	14	17.50	16	20.00	0.97	0.36	2.56	0,94
AA + CA/AA	11	13.75	07	8.75	1.80	0.55	5.89	0,33
GA+ CA/AA	11	13.75	07	8.75	1.80	0.55	5.89	0,33
GG+ CA/AA	09	11.25	09	11.25	1.14	0.36	3.68	0,82

326

<sup>a</sup> Binary logistic regression model adjusted for age and gender. *P*- values ≤0.05 were considered

327

significant.

328

329

**TABLE 4**

330

**Percentage of immunopositivity to cyclin D1 and P21/WAF1 monoclonal antibodies in individuals with oral squamous cell carcinoma (OSCC)**

331

332

<b>Gene</b>	<b>Genotypes, mean (range)</b>		<b>P-value</b>
<b>Cyclin D1</b>	GG	AA	0.42
	59.73 (44.5-77.4)	47.65 (11.8-66.1)	
<b>P21/WAF1</b>	CC	CA <sup>a</sup>	0.03
	37.65 (19.4-60.6)	56.75 (46.5-75.4)	

333

334 *P*- values from Mann-Whitney test. *P*-value  $\leq 0.05$  were considered significant.

335 <sup>a</sup> C/A genotype was used instead of AA due to the lack of samples.

336

337

338

339

## APRESENTAÇÃO

No Brasil, o câncer bucal é o 6º tipo de câncer mais comum em indivíduos do sexo masculino e o 7º mais comum no sexo feminino. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima uma incidência de 13470 novos casos de câncer de boca no Brasil em 2006. [1]

O termo “câncer de boca” é utilizado para definir todas as neoplasias malignas da cavidade oral, sendo que 90% destes casos são Carcinoma de Células Escamosas de Boca (CCEB). [2]

O fumo e o álcool representam os principais fatores ambientais relacionados com a etiologia do câncer de boca. Um estudo realizado em 2000 concluiu que indivíduos que consomem mais de vinte cigarros diários têm aproximadamente 12 vezes mais chance de desenvolver o câncer bucal em comparação com os que não fumam. [3]

A susceptibilidade do hospedeiro também tem importância na patogênese do CCEB, uma vez que esta neoplasia pode se desenvolver na ausência de fatores de risco. [4] O CCEB surge como consequência de múltiplos eventos genéticos moleculares em vários genes, com consequente distúrbio dos mecanismos de sinalização e regulação do ciclo de proliferação celular e/ou perturbações nos mecanismos de reparo do DNA ou apoptose. [4]

O ciclo celular é um processo complexo e organizado que visa assegurar que a divisão da célula ocorra apenas após replicação completa e precisa do DNA. São identificadas quatro fases no ciclo celular ativo, conhecidas como G1 (gap 1), S (síntese), G2 (gap 2) e M (mitose).[5] Há ainda a fase G0, que corresponde á fase em que células estão quiescentes.

A divisão celular é controlada pelo ambiente extracelular e por um sistema de controle intrínseco da célula. Foram reconhecidos até agora dois momentos específicos do ciclo celular, denominados “*checkpoints*”: um na transição G1-S e outro na transição G2-M. Estes pontos representam parados, nas quais é permitido à célula certificar-se não só da sua integridade, mas também se as condições do microambiente encontram-se favoráveis à sua sobrevivência. [6]

As principais classes de proteínas reguladoras do ciclo celular conhecidas são: quinases dependentes de ciclina (CDKs), ciclinas e inibidores de CDKs (CKIs). Todas estas proteínas regulam o trânsito da célula pelo ciclo, controlando não só a velocidade da proliferação como também checando sua integridade antes da duplicação. [5] A partir da ação coordenada dessas classes de proteínas se dá a progressão do ciclo celular. A associação das diferentes CDKs às suas ciclinas específicas formando os complexos ciclina/CDK determina a passagem pelas fases sucessivas.

A ciclina D1 é uma proteína regulatória chave do *checkpoint* G1-S. Ela forma complexos com cdk4 ou cdk6 e é responsável pela fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb), resultando na liberação dos fatores de transcrição E2F que permitem a entrada das células na fase S. [7,8] Frequentemente este *checkpoint* G1-S está alterado em tumores epiteliais humanos.

A proteína p21, produto do gene P21/WAF1, é um inibidor de CDK essencial para crescimento celular, diferenciação e apoptose. [9] A expressão do gene da P21/WAF1 é regulada pela p53 em resposta a danos ao DNA. A partir daí, ocorre associação da p21 a CDKs, impedindo a fosforilação de seus

substratos e bloqueando a progressão do ciclo celular. Esta paralisação dá à célula tempo para reparar o DNA, impedindo assim a replicação de DNA danificado.

Uma das características de grande parte dos tumores malignos é sua grande velocidade de proliferação, que parece ser resultado de um controle ineficiente dos elementos regulatórios do ciclo celular. [6] A proteína p21 atua inibindo o ciclo de divisão celular conferindo ao gene P21/WAF1 o papel de supressor tumoral. Dessa forma, alterações neste gene podem afetar diretamente a regulação da proliferação celular e, portanto, aumentar a susceptibilidade ao câncer. [10,11] Da mesma forma, como a ciclina D1 é uma proteína regulatória chave do *checkpoint* G1-S, alterações no gene CCND1 podem estar envolvidas na carcinogênese. Ativação e superexpressão do CCND1 foram demonstradas em uma variedade de tumores, como câncer de mama, cabeça e pescoço, laringe e pulmão. [12-14]

Os polimorfismos genéticos são definidos como variações na seqüência do DNA caracterizadas por substituições, deleções, inserções e duplicações de nucleotídeos, que ocorrem numa freqüência de pelo menos 1% da população estudada. Estas variações genéticas podem ou não causar alterações na expressão e/ou função do produto protéico.

O polimorfismo G870A no CCND1 é caracterizado por uma substituição de G (guanina) por A (adenina) e, apesar de não levar a uma mudança de aminoácido, o nucleotídeo variante aumenta a freqüência de um “*splicing*” alternativo. [15] A porção carboxi-terminal do transcrito alternativo não tem uma seqüência importante para a degradação da proteína, resultando possivelmente em uma meia-vida mais longa da mesma. [15] O polimorfismo

C98A do P21/WAF1 C98A é caracterizado por uma substituição de C (citosina) para A (adenina), resultando na substituição de serina por uma arginina[16] Esta substituição de serina por arginina poderia alterar a função protéica, apesar de não haver publicações sobre a relevância funcional deste polimorfismo .[17]

Este estudo é o primeiro a investigar o polimorfismo C98A do P21/WAF1 em CCEB. No entanto, o polimorfismo do codon 149 do P21/WAF1 já foi estudado em CCEB e outro grupo já pesquisou a freqüência do polimorfismo C98A em indivíduos com câncer de cabeça e pescoço. [18] Os resultados dos estudos deste polimorfismo do P21/WAF1 são conflitantes. Há estudos que encontraram associação do polimorfismo com o câncer de esôfago [19], por exemplo, mas há também estudos que não encontraram associação entre o polimorfismo e o câncer de pulmão. [20]

Da mesma forma, os resultados de estudos do polimorfismo G870A de CCND1 em CCEB são contraditórios. Enquanto um grupo não encontrou associação entre as variantes deste gene e o CCEB [21], outro grupo encontrou associação entre o genótipo GG e aumento de susceptibilidade ao CCEB. [22]

Considerando o papel da suscetibilidade do hospedeiro para o desenvolvimento do CCEB, o papel das proteínas p21 e ciclina D1 no controle do ciclo celular e o fato de não haver em literatura estudos do polimorfismo C98A do P21/WAF21 em CCEB, o objetivo deste estudo foi investigar a possível associação do polimorfismo do P21/WAF e do CCND1, isoladamente ou agrupados, e o risco de desenvolvimento desta neoplasia. Levando-se em consideração a falta de dados sobre o impacto destes polimorfismos sobre a

expressão da proteína, analisamos também a imunexpressão das duas proteínas em casos de CCEB de indivíduos com genótipo selvagem (“wild-type”) e polimórfico (variantes).

Optou-se por escrever esta dissertação em forma de artigo científico, (seguido pelas normas preconizadas pelo periódico), considerações finais e referências.

## SUMÁRIO

Apresentação-----	09
Artigo-----	14
Considerações finais-----	33
Referências-----	37
Anexos-----	41
Produção científica e atividades desenvolvidas durante o mestrado -----	49

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

A - adenina

C - citosina

CCEB - carcinoma de células escamosas de boca

CCND1 - gene da ciclina D1

CDK - quinase dependente de ciclina

CD1 - ciclina d1

CKI - inibidor de CDKs

G - guanina

G1 - gap 1

G2 - gap 2

INCA - Instituto Nacional do Câncer

M - mitose

OSCC - oral squamous cell carcinoma

pb - pares de base

PCR - polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

pRb - proteína do retinoblastoma

S- síntese

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

WAF1- wild-type p53 activated fragment 1

## **Variantes do P21/WAF1 e da Ciclina D1 no carcinoma de células escamosas de boca**

### **RESUMO**

Fatores genéticos estão sabidamente envolvidos com o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de boca (CCEB). Foi avaliada uma possível associação entre os polimorfismos G870A do CCND1 e C98A do P21/WAF1 e o CCEB, assim como o impacto do genótipo na imunexpressão da proteína. Não foi demonstrada associação estatística entre os genótipos de CCND1 e/ou de P21 com o CCEB. Entretanto, indivíduos que apresentaram combinação de pelo menos um dos alelos variantes de ambos os genes demonstraram ter 1.8 vezes mais chance de desenvolver CCEB do que aqueles com o genótipo referente. Além disto, os tumores de indivíduos com o genótipo heterozigoto de P21 apresentaram imunopositividade significativamente maior do que tumores de indivíduos com genótipo selvagem (“wild-type”), demonstrando que a expressão da proteína p21 em CCEB é afetada pelo genótipo de P21/WAF1.

**Descritores:** câncer bucal, polimorfismos genéticos, ciclo celular.

## **P21/ WAF1 and Cyclin D1 variants in oral squamous cell carcinoma**

### **ABSTRACT**

Genetic factors are known to be involved in oral squamous cell carcinoma (OSCC) development. We evaluated a possible association between CCND1 G870A and P21 C98A polymorphisms in OSCC, as well as the impact of the genotypes on protein immunoeexpression. No statistical association between CCND1 and/or P21 genotypes in OSCC was demonstrated, although we found that people harboring the combined presence of at least one variant allele of both genes showed a 1.8 times more chance of developing OSCC compared to the referent genotype. OSCC tumours from individuals with P21 heterozygous genotype showed a significantly higher immunopositivity than tumours from wild-type individuals, demonstrating that P21 protein expression in OSCC is affected by P21/WAF1 genotype.

**Key-words:** oral cancer, genetic polymorphisms, cell cycle

CAROLINA CAVALIÉRI GOMES

VARIANTES DO P21/WAF1 E DA CICLINA D1 E  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em odontologia.

Área de concentração: patologia bucal

Orientador: prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita

Co-orientador: prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Belo Horizonte

Faculdade de Odontologia da UFMG

2007

## REFERÊNCIAS

- [1] Instituto Nacional do Câncer [Base de dados na Internet]. Brasil: Ministério da Saúde [acesso em 2006 Dez 14] Estimativa 2006\_ Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>.
- [2] Leite ICG, Koifman S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients of a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Oral Oncol*, Oxford, 34 (5):347-52, 1998.
- [3] Moreno-Lopez LA, Esparza-Gomez GC, Gonzalez-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, Gonzalez-Hernandez MJ, Dominguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol* 2000; 36(2): 170-4.
- [4] Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol* 2000; 36(4): 311-27.
- [5] Gillett CE, Barnes DM. Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol*. 1998 Dec;51(6):310-6.
- [6] Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science*. 1994 Dec 16;266(5192):1821-8
- [7] Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*. 1994 Nov 18;79(4):573-82
- [8] Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274(5293): 1672-7.
- [9] Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 1993; 366(6456): 701-4.

- [10] Harada K, Ogden GR. An overview of the cell cycle arrest protein, p21 (WAF1). *Oral Oncol.* 2000 Jan;36(1):3-7.
- [11] Xi YG, Ding KY, Ren YH, Shen Y, Ke Y. Esophageal cancer in Chinese population: no polymorphism in codon 149 of P21 (Waf1/Cip1) cyclin dependent kinase gene. *Oncogene* 2002; 21(50):7745-8.
- [12] Keum JS, Kong G, Yang SC, Shin DH, Park SS, Lee JH, et al. Cyclin D1 overexpression is an indicator of poor prognosis in resectable non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 1999 Sep;81(1):127-32.
- [13] Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T. Alterations of Rb, p16 (INK4A) and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2000 160(1): 3-8.
- [14] Toyoda H, Nakamura T, Shinoda M, Suzuki T, Hatooka S, Kobayashi S, et al. Cyclin D1 expression is useful as a prognostic indicator for advanced esophageal carcinomas, but not for superficial tumors. *Dig Dis Sci* 2000 45(5):864-9.
- [15] Betticher DC, Thatcher N, Altermatt HJ, Hoban P, Ryder WD, Heighway J. Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* 1995; 11(5): 1005-11.
- [16] Chedid M, Michieli P, Lengel C, Huppi K, Givol D. A single nucleotide substitution at codon 31 (Ser/Arg) defines a polymorphism in a highly conserved region of the p53-inducible gene WAF1/CIP1. *Oncogene* 1994; 9(10): 3021-4.
- [17] el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumour suppression. *Cell* 1993; 75(4): 817-25.

- [18] Ralhan R, Agarwal S, Mathur M, Wasylyk B, Srivastava A. Association between polymorphism in p21 (Waf1/Cip1) cyclin-dependent kinase inhibitor gene and human oral cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6(6): 2440-7.
- [19] Wu MT, Wu DC, Hsu HK, Kao EL, Yang CH, Lee JM. Association between p21 codon 31 polymorphism and esophageal cancer risk in a Taiwanese population. *Cancer Lett* 2003; 201(2): 175-80.
- [20] Su L, Liu G, Zhou W, Xu LL, Miller DP, Park S, et al. No association between the p21 codon 31 serine-arginine polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003;12(2):174-5.
- [21] Sathyan KM, Nalinakumari KR, Abraham T, Kannan S. Influence of single nucleotide polymorphisms in H-Ras and cyclin D1 genes on oral cancer susceptibility. *Oral Oncol* 2006; 42(6): 607-13
- [22] Holley SL, Matthias C, Jahnke V, Fryer AA, Strange RC, Hoban PR. Association of cyclin D1 polymorphism with increased susceptibility to oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2005; 41(2): 156-60.
- [23] Zou GY, Donner A. The merits of testing Hardy-Weinberg equilibrium in the analysis of unmatched case-control data: a cautionary note. *Ann Hum Genet* 2006; 70(6): 923-33.
- [24] Casson AG, Zheng Z, Evans SC, Geldenhuys L, van Zanten SV, Veugelers PJ, et al. Cyclin D1 polymorphism (G870A) and risk for esophageal adenocarcinoma. *Cancer* 2005; 104(4): 730-9.
- [25] Lukas J, Groshen S, Saffari B, Niu N, Reles A, Wen WH, et al. WAF1/Cip1 gene polymorphism and expression in carcinomas of the breast, ovary and endometrium. *Am J Pathol* 1997; 150(1): 167-75.

- [26] Nemes JA, Nemes Z, Marton IJ. p21 WAF1/CIP1 expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005; 34(5): 274-9.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os possíveis genótipos do CCND1 eram AA (167pb), AG (167, 146,22 pb) e GG (146, 22 pb) e os possíveis genótipos de P21/WAF1 eram CC (142, 131 pb), CA (142, 131, 75,67 pb) e AA (75,67 pb) (ver anexo E, FIGURAS 1-4). Após a genotipagem das amostras, realizamos um teste chi-quadrado ajustado, como sugerido em um estudo recente [23], sem encontrar diferenças significativas entre os grupos caso e controle. De acordo com este estudo, a prática de se testar o equilíbrio de Hardy-Weinberg com a proposta de se identificar erros de genotipagem não se justifica, pois o que se tem em princípio ao testar este equilíbrio seria a seleção aleatória de amostra, ausência de seleção de acordo com o genótipo e ausência de mutação ou migração, sendo que todas estas situações são condições raras em populações humanas. O mais apropriado seria considerar *a priori* que desvios da equação de Hardy-Weinberg existem, devendo-se apenas realizar o teste qui-quadrado ajustado. Ainda segundo os autores, a realização da equação de Hardy-Weinberg seguida pelo qui-quadrado ajustado pode gerar confusão e resultados falso-positivos.

Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas na distribuição genotípica nas análises univariada e multivariada, foi demonstrada uma chance de se desenvolver CCEB 1,8 vezes maior em indivíduos com presença simultânea de pelo menos um alelo variante de cada gene, quando comparados com indivíduos com associação dos genótipos referentes (CCND1 GG + P21/WAF1 CC). Mesmo não sendo estatisticamente significativo, este dado suporta a idéia de que o câncer é uma alteração multigênica influenciada por polimorfismos genéticos.

De maneira geral, estudos de polimorfismos apresentam algumas limitações. O nosso estudo tem o número da amostra reduzido, no entanto, foi incluído no grupo caso uma quantidade de indivíduos correspondente a quase 60% dos casos estimados para Belo Horizonte em 2006. O INCA estimava uma incidência de 750 novos casos (7.7 /100000 habitantes) de câncer bucal em Minas Gerais no ano de 2006, sendo destes 140 casos (12.1/ 100000 habitantes) em Belo Horizonte. [1]

A maior parte dos estudos de polimorfismos determina apenas o genótipo dos indivíduos, sem correlacioná-los com o fenótipo. Realizamos a imunistoquímica em alguns tumores de indivíduos com o genótipo selvagem (“wild-type”) e polimórfico (ver anexo E, FIGURAS 5 e 6) para analisar se a imunexpressão das proteínas p21 e ciclina D1 sofre alteração de acordo com o genótipo do indivíduo.

Apesar de o alelo A do CCND1 aumentar a freqüência de transcritos com maior meia-vida, não encontramos diferenças quanto à imunexpressão da proteína ciclina D1 em casos de indivíduos com genótipo selvagem e polimórfico. Este resultado é semelhante ao de outro estudo deste mesmo polimorfismo em indivíduos com adenocarcinoma de esôfago, que também não encontrou correlação entre imunexpressão da proteína ciclina D1 e genótipo [24]. Por outro lado, um estudo com indivíduos com câncer de cabeça e pescoço encontrou menor imunexpressão de ciclina D1 em indivíduos com o genótipo GG quando comparados aos genótipos AA e AG. [22]

O polimorfismo C98A do gene P21/WAF1 pode levar a produção de uma proteína funcionalmente distinta. [17] Quanto à imunexpressão da proteína p21, verificamos que os tumores dos indivíduos carregando o alelo

variante A demonstraram maior imunexpressão de p21 do que os tumores de indivíduos com genótipo selvagem ( $p=0.03$ ). Nossos resultados são semelhantes aos de um estudo com indivíduos com carcinoma endometrial [25], embora neste mesmo estudo os autores não tenham encontrado relação entre genótipo de P21/WAF1 e imunexpressão da proteína em indivíduos com carcinoma de mama e de ovário. Outro estudo analisando os níveis de mRNA de p21 em indivíduos com câncer de pulmão concluiu que indivíduos com os genótipos variantes nos grupos caso e controle exibiam diminuição nos níveis de mRNA quando comparados com indivíduos com o genótipo CC. [20] Estes achados sugerem que um padrão de expressão do P21/WAF1 tecido-específico em tumores diferentes parece se uma característica de cada tipo de tumor. [25] É importante ressaltar que sendo este padrão de imunexpressão específico de cada tipo de tumor, não foram incluídos no presente estudo indivíduos com lesão só de palato mole (por se tratar de orofaringe) e nem câncer de lábio (por se tratar de diferente etiologia).

Como já foi previamente demonstrada uma associação entre superexpressão de p21 e baixo prognóstico e diminuição de sobrevida de indivíduos com CCEB ( $p=0.01$ ) [26], os nossos resultados sugerem que indivíduos com genótipo CA podem ter um pior prognóstico e uma menor sobrevida do que aqueles de genótipo CC, apesar de o número de casos utilizados neste estudo ter sido reduzido. Novos estudos populacionais analisando correlação entre genótipo e sobrevida seriam interessantes para elucidar esta associação sugerida.

Os polimorfismos são candidatos para investigações de susceptibilidade genética e podem se tornar marcadores para a identificação da população com

predisposição aumentada para o câncer. Além disto, estudos correlacionando genótipo, prognóstico e sobrevida são necessários para elucidar o papel das variantes dos genes estudados no presente estudo como marcadores prognósticos e de sobrevida.

## **PRODUÇÃO CIENTÍFICA E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O MESTRADO**

### **A) Trabalhos resumidos apresentados em eventos nacionais**

- Santana MVM, Barroso EC, Gomes CC, Aguiar MCF, Mesquita RA. Leiomiossarcoma de Palato. XII Jornada Mineira de Estomatologia. FAFEID (Faculdades Federais Integradas de Diamantina) 02 a 04 de junho de 2005 em Diamantina (MG).
- Horta MCR, Marigo HA, Gomes CC, Mesquita RA, Gomez RS. Caso clínico: Coristoma Glial em Língua. XIII Congresso Brasileiro de Estomatologia, 16 a 20 de julho de 2005 no centro de cultura e eventos da UFSC em Florianópolis (SC).
- Gomes CC, Pimenta FJGS, Barbosa AA, Perdigão PF, Gomez MV, Aldaz CM, Marco LA, Gomez RS. Análise Molecular do Gene WWOX no Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Bucal. 22<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 03 a 07 de setembro de 2005 em Águas de Lindóia (SP).
- Resende RG, Gomes CC, JTC Lacerda, Carmo MAV, Gómez RS. Carcinoma Sebáceo Oral. XIII Jornada Mineira de Estomatologia (JOME), 25 a 27 de maio de 2006 em Caxambu (MG).
- Gomes CC, Guimarães AL, Costa FO, Correia JF, Diniz MG, Gomez RS. IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms in individuals with RAS. 23<sup>a</sup> Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 04 a 06 de setembro de 2006 em Atibaia (SP).

**B) Trabalhos resumidos apresentados em eventos internacionais**

- Gomes CC, Pimenta FJG, Perdigão PF, Castro WH, Teh BT, Gómez RS.  
HRPT2 gene alterations in ossifying fibroma of the jaws. XIII Congresso Bianual da Associação Internacional de Patologia, 21 e 24 de junho de 2006. Local: Brisbane (Austrália).

**C) Artigos completos publicados em periódicos**

1. Silva EC, Guimarães AL, Gomes CC, Gomez RS. Ganglion cyst of the temporomandibular joint. Br J Oral Maxillofac Surg. 2005; 43(1): 77-80.
2. Silva LM, Guimarães ALS, Victória JMN, Gomes CC, Gomez RS. Herpes simplex virus type 1 shedding in the oral cavity of seropositive patients. Oral Dis. 2005; 11(1):13-6.
3. Horta MCR, Marigo HA, Syrio NFL, Silveira Júnior JB, Gomes CC, Mesquita RA, Gomez RS. Oral glial choristoma: a case report. Oral Oncol Extra 2005; 41:53-5.
4. Gomes CC, Gomez RS, Carmo MA, Castro WH, Gala-Garcia A, Mesquita RA. Mucosal varicosities: case report treated with monoethanolamine oleate. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2006; 11(1): E44-6.
5. Guimarães ALS, Silva LM, Gomes CC, Castro WH, Mesquita RA, Gomez RS. Peripheral Brown tumour of hyperparathyroidism in the oral cavity. Oral Oncology Extra 2006; 42, 91-3.
6. Gomes CC, Naves MD, Pereira MV, Silva LM, Mesquita RA, Gomes RS. Granular cell odontogenic tumour: case report and review of literature. Oral Oncology Extra 2006; 42: 277-80.

7. Correia-Silva JD, Neto Victoria JM, Guimarães AL, Sa AR, Gomes CC, Almeida HC, Gómez RS. Helicobacter pylori in the oral mucosa of patients submitted to allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Pesq Odontol Bras. 2006; 20(3): 191-5.
8. Gomes CC, Gomez RS. Odontogenic keratocyst: A benign cystic neoplasm? Oral Oncol 2006; Dec 13. Article in Press
9. Gomes CC, Lacerda JC, Pimenta FJ, do Carmo MA, Gomez RS. Intraoral sebaceous carcinoma. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2007 Feb 7. Article in Press
10. Souza LN, Souza ACRA, Gomes CC, Loyola AM, Durigheto-Júnior AF, Gomez RS, Castro WH. Conservative treatment of calcifying odontogenic cyst: report of three cases. J Oral Maxillofac Surg 2006. Article in Press.

#### **D) Participação em eventos**

- XII Jornada Mineira de Estomatologia realizada nas FAFEID, 02 a 04 de junho de 2005 em Diamantina (MG).
- XIII Congresso Brasileiro de Estomatologia, Centro de Cultura e Eventos da UFSC. 16 a 20 de julho de 2005 em Florianópolis (SC).
- 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 03 a 07 de setembro de 2005 em águas de Lindóia (SP).
- 3º Encontro de Editores e Autores de Periódicos Científicos de Odontologia, 07 a 09 de novembro de 2005 em Belo Horizonte (MG).
- XIII Jornada Mineira de Estomatologia (JOME) , 25 a 27 de maio de 2006 em Caxambu (MG).

- XIII Congresso Bianual da Associação Internacional de Patologia Bucal, 21 a 24 de junho de 2006 em Brisbane (Austrália).
- 23ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 04 a 06 de setembro de 2006 em Atibaia (SP).

## ANEXO A

### INFORMAÇÕES AO PACIENTE- CASOS

Meu nome é Carolina Cavalieri Gomes, Cirurgiã-Dentista. Sou aluna do Curso de Mestrado em Odontologia/ FOUFG, orientada pelo professor Ricardo Alves de Mesquita e sou responsável pela pesquisa intitulada “Variantes do P21/WAF1 e da ciclina D1e carcinoma de células escamosas de boca”.

O objetivo deste trabalho é aumentar os conhecimentos a respeito do câncer de boca, especialmente alterações relacionadas ao seu DNA. Estas alterações podem o tornar mais susceptível a desenvolver a doença.

O DNA está presente dentro das células. As células são uma das menores partes do nosso corpo. O DNA é responsável pela formação e desenvolvimento de todas as estruturas do nosso corpo (por exemplo: dentes, pele, ossos...).

Para que então possamos estudar seu DNA, necessitaremos coletar um pouco de sua saliva (raspar sua boca) para se obter células e, a partir daí, obter seu DNA. Esta raspagem será realizada com uma escovinha estéril, não causará dor, não causará agravamento de sua lesão e nem faz parte do tratamento desta doença.

Você terá o direito de desistir da participação desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo a você.

Os resultados obtidos após a conclusão deste trabalho serão publicados em veículos científicos, respeitando sempre seu direito de não ser identificado.

Se houver alguma dúvida a respeito deste trabalho você poderá se comunicar comigo pelo telefone (31)34992477.

Você poderá também ligar para o COEP (31)34994027 para obter os esclarecimentos necessários. (Parecer ETIC 564/04). Unidade Administrativa II, 2º andar. Campus Pampulha

#### **Termo de consentimento livre e esclarecido**

Eu, \_\_\_\_\_, identidade nº \_\_\_\_\_, declaro que concordo em participar desta pesquisa, não sendo responsável por nenhum tipo de despesa relacionada ao desenvolvimento deste trabalho, e que não receberei qualquer pagamento pela participação neste estudo.

Declaro também que não houve nenhum tipo de pressão para eu contribuir com esta pesquisa, que fui suficientemente informado a respeito dos objetivos deste trabalho e da maneira pela qual será realizada a coleta do material.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_

Assinatura do paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

## ANEXO B

### INFORMAÇÕES AO PACIENTE - CONTROLE

Meu nome é Carolina Cavaliere Gomes, Cirurgiã-Dentista. Sou aluna do Curso de Mestrado em Odontologia/ FOUFMG, orientada pelo professor Ricardo Alves de Mesquita e sou responsável pela pesquisa intitulada “Variantes do P21/WAF1 e da ciclina D1e carcinoma de células escamosas de boca”.

Queremos estudar alterações relacionadas ao DNA que são responsáveis pelo aparecimento de certas doenças. Para isto, precisamos também estudar o DNA de pessoas que não estejam doentes,

O DNA está presente dentro das células. As células são uma das menores partes do nosso corpo. O DNA é responsável pela formação e desenvolvimento de todas as estruturas do nosso corpo (por exemplo: dentes, pele, cabelo, ossos, etc.).

Para que então possamos estudar seu DNA, necessitaremos coletar um pouco de sua saliva (raspar sua boca) para se obter células e, a partir daí, obter seu DNA. Esta raspagem será realizada com uma escovinha estéril e não causará dor.

Você terá o direito de desistir da participação desta pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo a você.

Os resultados obtidos após a conclusão deste trabalho serão publicados em veículos científicos, respeitando sempre seu direito de não ser identificado.

Se houver alguma dúvida a respeito deste trabalho você poderá se comunicar comigo pelo telefone (31)34992477.

Você poderá também ligar para o COEP (31)34994027 para obter os esclarecimentos necessários. (Parecer ETIC 564/04). Unidade Administrativa II, 2º andar. Campus Pampulha

#### **Termo de consentimento livre e esclarecido**

Eu, \_\_\_\_\_, identidade nº \_\_\_\_\_, declaro que concordo em participar desta pesquisa, não sendo responsável por nenhum tipo de despesa relacionada ao desenvolvimento deste trabalho, e que não receberei qualquer pagamento pela participação neste estudo.

Declaro também que não houve nenhum tipo de pressão para eu contribuir com esta pesquisa, que fui suficientemente informado a respeito dos objetivos deste trabalho e da maneira pela qual será realizada a coleta do material.

Belo Horizonte, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_

Assinatura do paciente ou responsável: \_\_\_\_\_

**ANEXO C****FICHA CLÍNICA - GRUPO CASO****DATA DA COLETA:**

Nome: \_\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Cor: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Filiação: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Profissão: \_\_\_\_\_ telefone: \_\_\_\_\_

**Tabagismo**

Tipo: \_\_\_\_\_

Frequência diária: \_\_\_\_\_

Duração: \_\_\_\_\_

**Etilismo**

Tipo: \_\_\_\_\_

Frequência diária: \_\_\_\_\_

Duração: \_\_\_\_\_

Localização da lesão: \_\_\_\_\_

Tempo de evolução: \_\_\_\_\_

Diagnóstico histopatológico: \_\_\_\_\_

Tratamento instituído \_\_\_\_\_

Local da coleta: \_\_\_\_\_

Prontuário n°.: \_\_\_\_\_

**ANEXO D****FICHA CLÍNICA – GRUPO CONTROLE****DATA DA COLETA:**

Nome: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_

Data nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Cor: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

**Tabagismo**

Tipo: \_\_\_\_\_

Quantidade diária: \_\_\_\_\_

Duração do hábito: \_\_\_\_\_

**Etilismo**

Tipo: \_\_\_\_\_

Quantidade diária: \_\_\_\_\_

Duração do hábito: \_\_\_\_\_

Local da coleta: \_\_\_\_\_

## ANEXO E

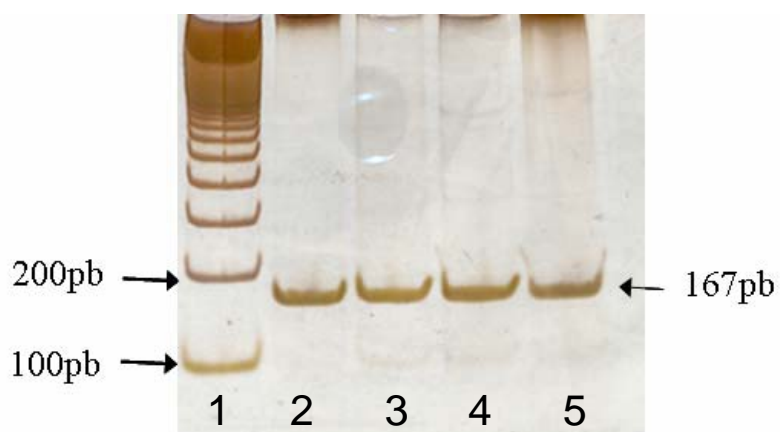


Figura 1 - Gel de poliacrilamida a 6,5% referente aos produtos de PCR do gene CCND1 (167pb). Canaleta 1 (padrão de peso molecular), canaletas 2-5 referentes a amostras de 4 indivíduos.

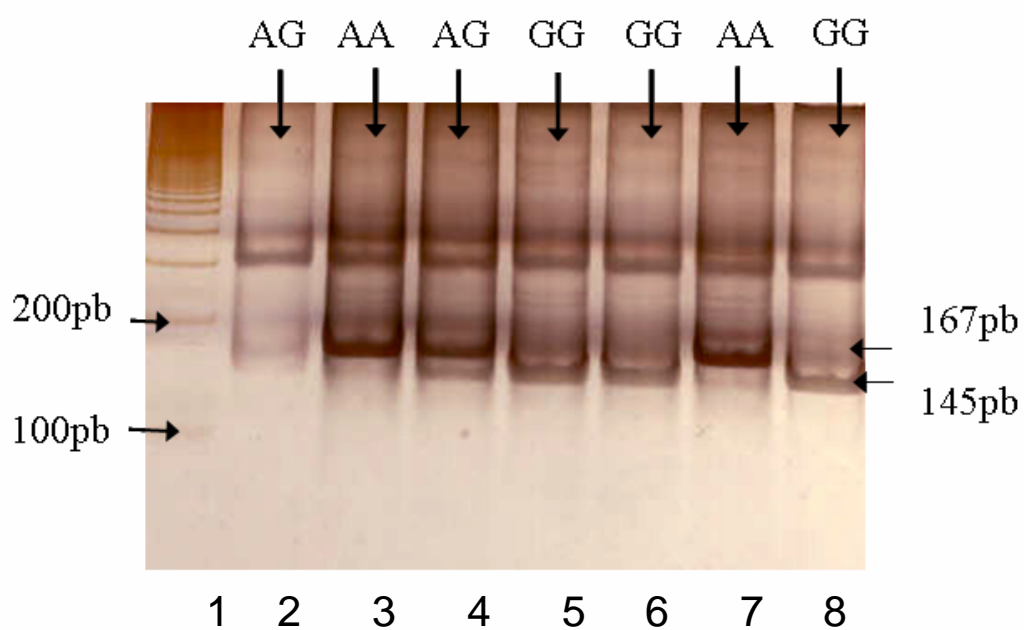


Figura 2 - Gel de poliacrilamida a 10% referente aos produtos da digestão do PCR do gene CCND1. Canaleta 1 (padrão de peso molecular), canaletas 2 e 4 referentes a amostras de genótipos AG, canaletas 3 e 7 referentes a amostras de genótipos AA e canaletas 5, 6 e 8 representando o genótipo GG.

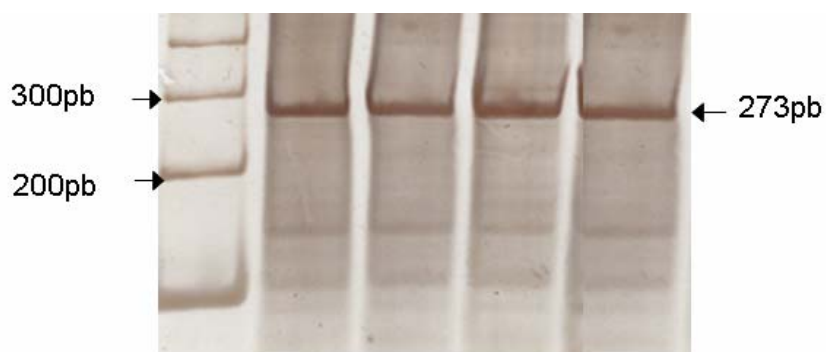


Figura 3 - Gel de poliacrilamida a 6,5% referente aos produtos de PCR do gene P21/WAF1 (273pb). Canaleta 1 (padrão de peso molecular), canaletas 2-5 referentes a amostras de 4 indivíduos.

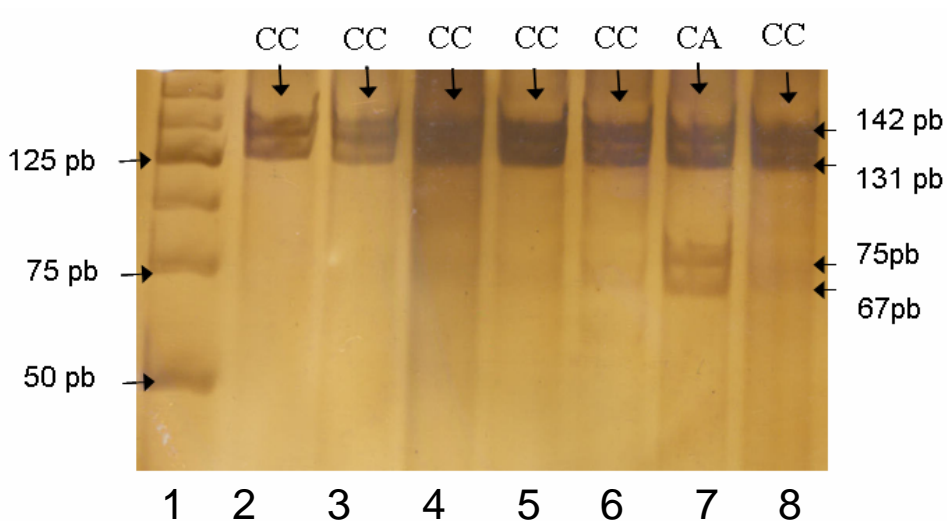


Figura 4 - Gel de poliacrilamida a 10% referente aos produtos da digestão do PCR do gene P21/WAF1. Canaleta 1 (padrão de peso molecular), canaletas 2-6 e 8 referentes a genótipo CC (selvagem) e canaleta 7 representando o genótipo CA (polimórfico heterozigoto).

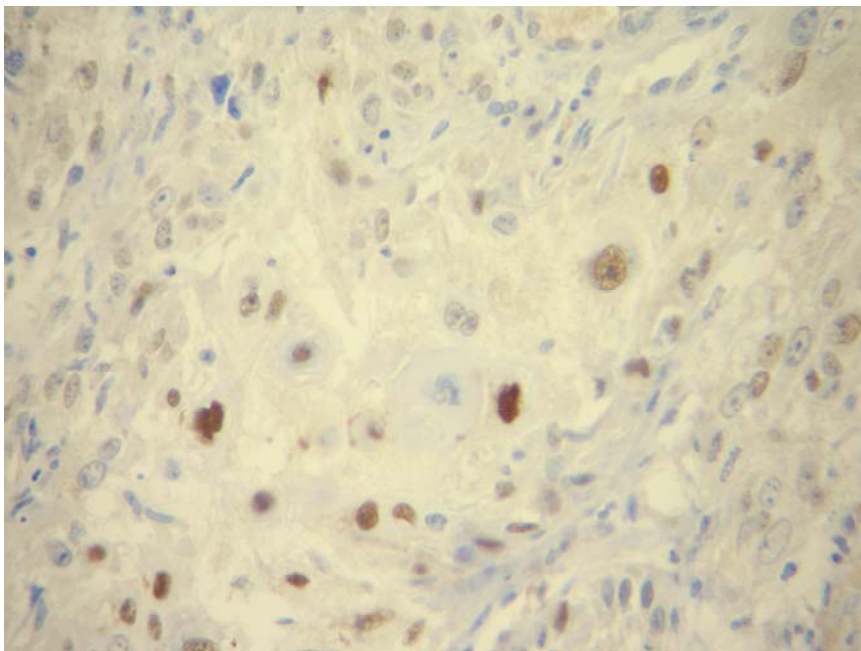


Figura 5 - Imunolocalização da proteína ciclina D1 em carcinoma de células escamosas de boca. (400X)

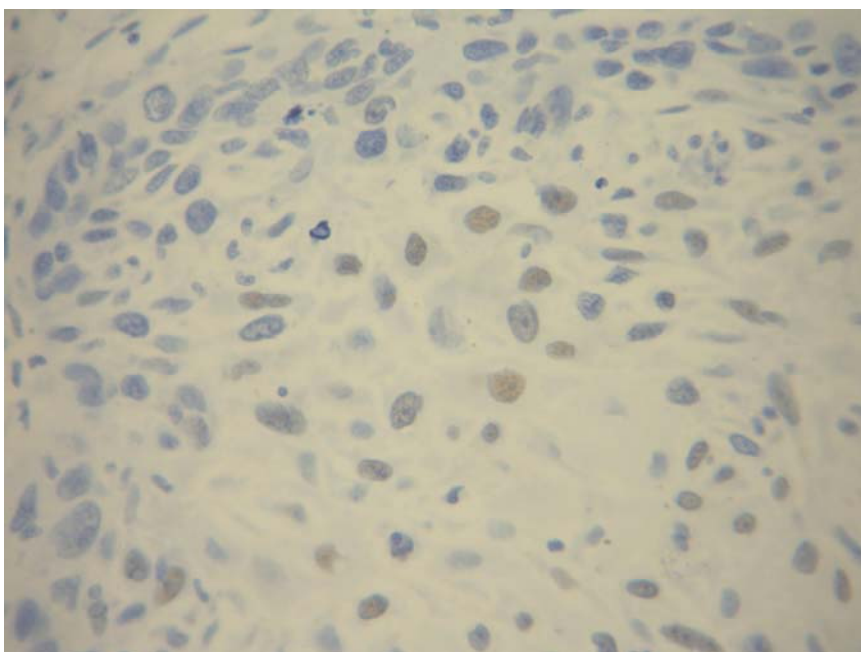


Figura 6 - Imunolocalização da proteína p21 em carcinoma de células escamosas de boca. (400X)



Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

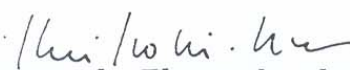
**Parecer nº. ETIC 564/04**

**Interessado: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez**  
**Departamento Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológica**  
**Faculdade de Odontologia - UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 16 de fevereiro de 2005, o projeto de pesquisa intitulado « **Polimorfismo do Codon 31 do Gene TP21 em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Boca** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
P/ **Prof. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP/UFMG**