

**GEFTER THIAGO BATISTA CORREA**

**INVESTIGAÇÃO DA PERDA DE HETEROZIGIDADE EM 9P, 9Q E 17P E  
DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS DO *TP53* EM QUEILITE ACTÍNICA E  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**BELO HORIZONTE**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**Gefter Thiago Batista Correa**

**Investigação da perda de heteroziguidade em 9p, 9q e 17p e de mutações somáticas do *TP53* em queilite actínica e carcinoma de células escamosas de lábio**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Molecular**

**Orientadora: Profa. Dra. Carolina Cavaliere Gomes**

**Coorientadora: Profa. Dra. Vanessa de Fátima Bernardes**

**Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez**

**BELO HORIZONTE**

**2015**

C824r      Correa, Gefer Thiago Batista.  
Investigação da perda de heterozigozidade em 9p, 9q e 17p e de mutações somáticas do TP53 em queilite actínica e carcinoma de células escamosas de lábio [manuscrito]. / Gefer Thiago Batista Correa. - - Belo Horizonte: 2015.  
127f.: il.  
Orientador: Carolina Cavalieri Gomes.  
Coorientador: Vanessa de Fátima Bernardes.  
Área de concentração: Medicina Molecular.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

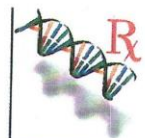
1. Carcinoma de Células Escamosas. 2. Queilite. 3. Perda de Heterozigosidade. 4. Neoplasias Labiais. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Gomes, Carolina Cavalieri. II. Bernardes, Vanessa de Fátima. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.  
NLM: WU 280

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



## ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO GEFTER THIAGO BATISTA CORREA

Realizou-se, no dia 15 de junho de 2015, às 14:00 horas, Sala 3412 da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *INVESTIGAÇÃO DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE EM 9P, 9Q E 17P E DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS DO TP53 EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO*, apresentada por GEFTER THIAGO BATISTA CORREA, número de registro 2011709037, graduado no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Vanessa de Fatima Bernardes (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof. Ricardo Santiago Gomez (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Monica Maria Demas Alvares Cabral (UFMG), Prof(a). Luciana Maria Silva (FUNED), Prof(a). Soraya de Mattos Camargo Grossmann Almeida (Universidade Vale do Rio Verde de Três Corações), Prof. Enio Ferreira (Universidade Federal de Minas Gerais).

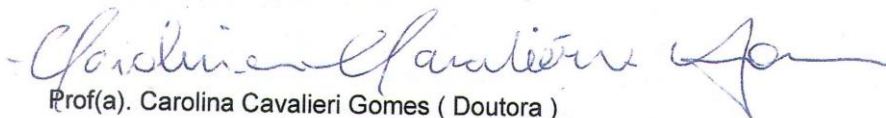
A Comissão considerou a tese:


Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 15 de junho de 2015.

  
Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes ( Doutora )

  
Prof(a). Vanessa de Fatima Bernardes ( Doutor )

  
Prof. Ricardo Santiago Gomez ( Doutor )

  
Prof(a). Monica Maria Demas Alvares Cabral ( Doutora )

  
Prof(a). Luciana Maria Silva ( Doutora )

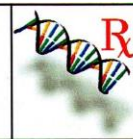
  
Prof(a). Soraya de Mattos Camargo Grossmann Almeida ( Doutora )

  
Prof. Enio Ferreira ( Doutor )



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**INVESTIGAÇÃO DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE EM 9P, 9Q E 17P E DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS DO TP53 EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO**

### **GEFTER THIAGO BATISTA CORREA**

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 15 de junho de 2015, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes - Orientador  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Vanessa de Fatima Bernardes  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Ricardo Santiago Gomez  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Monica Maria Demas Alvares Cabral  
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Luciana Maria Silva  
FUNED

Prof(a). Soraya de Mattos Camargo Grossmann Almeida  
Universidade Vale do Rio Verde de Três Corações

Prof(a). Eraldo Ferreira  
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 15 de junho de 2015.

*And you run, and you run, to catch up with the sun  
But it's sinking  
And racing around to come up behind you again  
The sun is the same in a relative way  
But you're older  
Shorter of breath and one day closer to death*

***Time – Pink Floyd***

*Dedico este trabalho de Doutorado primeiramente a Deus e  
a todos os que me acompanharam durante toda a jornada  
da minha vida: meus pais Gilson e Tânia e meus irmãos*

*Júnior e Gabriel*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, meu único mestre e salvador, pela sabedoria, graças e dons derramados sobre mim. Agradeço por ter abençoado e iluminado meus caminhos e por jamais me abandonar na caminhada.

Agradeço aos meus pais, Gilson e Tânia, por todo amor dado a mim nessa vida, pelo apoio incondicional, pelas palavras de sabedoria e por me transformarem no que sou hoje. Agradeço também aos meus irmãos Júnior e Gabriel, grandes companheiros, indispensáveis nessa caminhada da vida.

A minha orientadora, professora Carolina Cavalieri Gomes, um verdadeiro exemplo de profissional, por ter me guiado por todo este curso, com muita competência e dedicação, sou eternamente grato por tudo. Foi uma honra poder ter sido seu orientando, Carol!

Ao professor Ricardo Santiago Gomez, que, graças a seu trabalho e dedicação, permitiu a inúmeras pessoas realizar o sonho da pós-graduação. Obrigado por ter me aberto as portas e agradeço-lhe pela coorientação.

A professora Vanessa de Fátima Bernardes, por toda a paciência, carinho e presteza! Sua coorientação foi fundamental para a conclusão deste trabalho!

A todos meus amigos incontáveis e insubstituíveis que sempre torceram e torcem por mim. Em especial, agradeço a Petrônio, Bisa, Ionara, Regiel Cleriston, Júlio, Bruno e Flávia! Valeu galera! Também agradeço ao Sr. Joaquim Cândido e a Sra Édina Silva, meus segundos pais, principalmente por terem me ajudado com a moradia em Belo Horizonte.

Agradeço muito aos meus dois grandes amigos e companheiros do doutorado: Fabrício Tinôco Alvim de Souza e Sílvia Ferreira de Sousa, fundamentais para que eu conseguisse concluir mais essa etapa da minha vida. É uma honra tê-los como amigos.



Aos meus amigos de laboratório com quem tive o prazer de trabalhar e conviver: Lucyana Conceição Farias, Ana Carolina Mesquita Netto Rosales, João Artur Ricieri Brito, Thais Santos, Jeane de Fátima Correia, Fabrício Amaral, Renata Gonçalves Resende, Elizete Maria Rita Pereira, Telma Arão, Clarice Galvão, Alessandra Duarte, Lissur Azevedo Orsine, Leonardo Nogueira, Elisa Carvalho de Siqueira, Flavia Amaral, Núbia, Graciele, Ana Carolina, Nathália e Daniele Ramalho. Em especial, agradeço a Bruna Antonini, Flávia Fonseca, Kelma Campos e Marina Diniz.

Agradeço aos Professores: Ricardo Alves Mesquita, Adriano Mota Loyola, André Luiz Sena Guimarães, Mônica Maria Demas Alvares Cabral, José Maria Porcaro Salles e Alfredo Maurício Batista de Paula, pelas inestimáveis colaborações.

Ao Instituto Alfa de Gastrenterologia, serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Em especial, agradeço os médicos: Alexandre, Gustavo, Guilherme, Jomar, Henrique, Sebastião, Duílio, Diogo e Lívio, pelo acolhimento, respeito, amizade e aprendizado que pude obter com vocês. Experiência ímpar poder ter feito parte desse grupo!

Ao Professor Renan Pedra, pela ajuda com o trabalho de estatística que contribuiu muito com a pesquisa.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos e ao CNPQ, Conselho Nacional de Pesquisa, pelo financiamento do projeto.

Ao centro de processamento e aquisição de imagens /ICB/UFMG, pela utilização de sua estrutura para o desenvolvimento da pesquisa.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para possibilitar a conclusão de mais um ciclo que chega ao fim.

## Resumo

**Introdução:** O carcinoma de células escamosas de lábio (CCEL) representa aproximadamente 30% dos carcinomas da cavidade oral e 2% de todos os cânceres humanos. A etiologia do CCEL é altamente relacionada com a exposição à radiação ultravioleta (UV). A queilite actínica (QA) é uma lesão em placa branco-vermelha com áreas ulcerativas, por vezes sob a forma de crosta, que afeta a totalidade ou parte do lábio. A QA é considerada uma lesão cancerizável do lábio e apresenta fatores etiológicos e características clínicas semelhantes ao CCEL. A perda de heterozigidade (LOH) é definida como a perda de um alelo de um locus heterozigoto constitucional. O gene *TP53* caracteriza-se como um gene supressor de tumor muito frequentemente alterado nas neoplasias malignas de boca. **Objetivo:** Investigar LOH em regiões genômicas que anteriormente mostraram uma alta frequência de LOH em neoplasias malignas epiteliais e investigar mutações nos éxons do *TP53*. **Metodologia:** Utilizou-se 17 amostras de CCEL e 16 de QA obtidas por conveniência nos arquivos da Faculdade de Odontologia da UFMG. O DNA dos tecidos normal e tumoral foi extraído, amplificado por PCR e analisado por meio de 6 marcadores para regiões microssatélites próximas a genes supressores de tumor (*TP53*, AFM238WF2, D9S157, D9S162, D9S171, D9S287) e foram sequenciados os éxons 5 a 9 do gene *TP53*. Nos 5 casos de CCEL coletados frescos foi realizado sequenciamento dos éxons 2 ao 11 do *TP53* (2 a 11). A análise da LOH foi realizada após a eletroforese capilar dos produtos de PCR. Foi realizado imunohistoquímica para as proteínas p53 e ki-67. **Resultados:** A LOH ocorreu em pelo menos um marcador em 15 de 17 amostras de CCEL e em nove de 16 amostras de QA. O marcador que mostrou maior frequência de LOH em CCEL foi o D9S157 (8/12 casos informativos) e o D9S287 em QA (4/11 casos informativos). Os resultados da imunohistoquímica não foram associados com LOH em nenhum dos marcadores investigados. Foram encontradas mutações *missense* no gene *TP53* em ambos os grupos de lesões, e mutações *nonsense* em CCEL, incluindo uma transição CC>TT. Esta última mutação é considerada uma assinatura da radiação UV. **Conclusões:** Mutações do *TP53* e LOH estão presentes nas lesões de CCEL e QA, e podem fazer parte da patogênese molecular dessas lesões.

**Palavras chave:** carcinoma de células escamosas de lábio, queilite actínica, perda de heterozigidade, LOH, radiação UV.

## Abstract

**Objectives:** Lip squamous cell carcinoma (LSCC) and actinic cheilitis (AC) molecular pathogenesis is unclear. We aimed to assess loss of heterozygosity (LOH) and *TP53* mutations in these lesions. **Materials and Methods:** Formalin fixed paraffin-embedded (FFPE) samples of 17 LSCC and 16 AC were included. 5 fresh LSCC were added for the *TP53* sequencing. We assessed LOH by using 6 polymorphic markers located at 9p22, 9q22 and 17p13 and associated these results with cell proliferation (Ki-67) and P53 immunostaining. Direct sequencing of *TP53* exons 2–11 was performed in the fresh samples, and exons 5-9 in the FFPE. **Results:** LOH occurred in at least one marker in 15/17 LSCC and in 9/16 AC. The marker that showed higher frequency of allelic loss (FAL) in LSCC was D9S157 (8/12 informative cases), and D9S287 in AC (4/11 informative cases). IHC results were not associated with LOH or with the FAL. We found *TP53* missense mutations in both lesions and nonsense in LSCC, including CC>TT transition, which is an UV signature. **Conclusion:** LOH and *TP53* mutations occurred in LSCC and AC, which may be part of their molecular pathogenesis.

**Keywords:** actinic cheilitis, mutations, lip cancer, LOH, oral cancer, p53, potentially malignant oral lesions, lip squamous cell carcinoma, head and neck cancer

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Descrição da procedência e do tipo de material utilizado na pesquisa.....	45
Tabela 2: Dados clínicos dos pacientes de QA do estudo .....	56
Tabela 3: Positividade das células imunomarcadas para p53 e Ki-67 nos casos de QA do estudo .....	57
Tabela 4: Dados dos marcadores utilizados para analisar LOH nas amostras de QA .	58
Tabela 5: Resultados da LOH comparados com características clínicas.....	60
Tabela 6: Dados clínicos e imunohistoquímicos e demográficos dos casos de CCEL ..	62
Tabela 7: Dados da LOH das amostras de CCEL. ....	63
Tabela 8: Teste do qui-quadrado para as características clínicopatológicas e imunohistoquímica dos pacientes de CCEL e QA. ....	65
Tabela 9: Resumo dos éxons sequenciados em cada amostra fresca de CCEL. ....	67
Tabela 10: Mutações e SNPs do gene TP53 encontrados nos carcinomas de células escamosas de lábio.....	69
Tabela 11: Consolidado dos resultados de LOH e do sequenciamento genético do TP53 das amostras de QA e CCEL .....	72
Tabela 12: Resultados da LOH comparados com características clínicas do CCEL ...	110

## Lista de Figuras

Figura 1: Aspecto clínico da QA em lábio inferior .....	24
Figura 2: Aspecto clínico do CCEL em lábio inferior.....	30
Figura 3: Amostra histopatológica de uma amostra de CCEL.....	42
Figura 4: Delineamento e sequência de eventos para obtenção e processamento das amostras do estudo. ....	44
Figura 5: Localização dos marcadores nos cromossomos 9p, 9q e 17p .....	47
Figura 6: Expressão imunohistoquímica das proteínas p53 e Ki-67 em CCEL .....	62
Figura 7: Exemplos representativos de LOH em CCEL .....	64
Figura 8: Eletrofeograma de uma amostra congelada de CCEL .....	68
Figura 9: Localização das mutações exônicas encontradas no presente estudo.....	71

## Lista de Quadros

Quadro 1: Marcadores microssatélites de LOH utilizados no estudo ..... 48

Quadro 2: Marcadores genéticos utilizados no estudo da mutação dos éxons do TP53 51

## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Frequência de perda alélica dos marcadores nos casos de QA .....	58
Gráfico 2: Frequência de perda alélica dos marcadores nos casos de CCEL.....	64
Gráfico 3: Forest plot da LOH do dos marcadores dos cromossomos 9 e 17 comparados entre as lesões de QA e CCEL. ....	66

## Lista de siglas e abreviaturas

<b>µl</b>	Microlitro (s)
<b>µm</b>	Micrômetro (s)
<b>A</b>	Adenina
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BSA</b>	Do inglês: <i>Bovine serum albumin</i>
<b>C</b>	Citosina
<b>CCE</b>	Carcinoma de Células Escamosas
<b>CCEB</b>	Carcinoma de Células Escamosas de Boca
<b>CCEL</b>	Carcinoma de Células Escamosas de Lábio
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CNS</b>	Conselho Nacional da Saúde
<b>CPD</b>	Pirimidina-ciclobutanos
<b>CT</b>	Do inglês: <i>Threshold cycle</i>
<b>CTP</b>	Citidina trifosfato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNase</b>	Desoxirribonuclease
<b>dNTPs</b>	Desoxinucleotídeos
<b>EDTA</b>	Do inglês: <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>F</b>	Do ingles: <i>Forward</i>
<b>FGF</b>	Do ingles: <i>Fibroblast growth factor</i>
<b>G</b>	Força Gravitacional
<b>g/l</b>	Gramas por litro
<b>G</b>	Guanina
<b>H</b>	Hora (s)
<b>HPV</b>	Papilomavírus Humano
<b>Kb</b>	Quilo pares de base
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>LOH</b>	Do inglês: <i>Loss of heterozygosity</i>
<b>M</b>	Molar
<b>mg/mL</b>	Miligrama por microlitro
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>Min</b>	Minuto (s)
<b>mL</b>	Mililitro (s)
<b>mM</b>	Milimolar
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde



<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaOAc</b>	Acetato de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>QA</b>	Queilite Actínica
<b>Pb</b>	Par (es) de bases
<b>PBS</b>	Do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Do inglês: <i>Polymerase chain reaction</i>
<b>R</b>	Do inglês: <i>Reverse</i>
<b>Rcf</b>	Força centrífuga relativa
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAm</b>	RNA mensageiro
<b>Rnase</b>	Ribonuclease
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>S</b>	Segundo (s)
<b>SV40</b>	Vírus Símio 40
<b>SSC</b>	Do inglês: <i>Saline sodium cytrate</i>
<b>T</b>	Timina
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TNM</b>	Estadiamento TNM
<b>Tris HCl</b>	Do inglês: <i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UVA</b>	Raios ultravioleta A
<b>UVB</b>	Raios ultravioleta B
<b>UVC</b>	Raios ultravioleta C
<b>U/μl</b>	Unidades por microlitro
<b>UK</b>	Reino Unido
<b>UTP</b>	Uridina Trifosfato
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Volts

## Sumário

1.Introdução.....	20
2. Revisão de literatura.....	23
2.1. Queilite Actínica.....	23
2.1.1 Sinónímias, breve histórico e conceito.....	23
2.1.2 Aspectos epidemiológicos, etiopatológicos e clínicos da QA.....	24
2.1.3 Características Histopatológicas.....	27
2.2 Carcinoma de Células Escamosas.....	28
2.2.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos do Carcinoma de Células Escamosas de Lábio.....	28
2.2.2 Etiopatogênese do CCEL.....	30
2.2.3 Prognóstico e tratamento do CCEL.....	30
2.2.3.1 Sistema TNM para os tumores malignos do lábio.....	31
2.2.4 Características histopatológicas.....	33
2.3 Carcinogênese.....	34
2.3.1 A Radiação UV.....	34
2.3.2 Perda de heterozigidade em regiões de genes supressores de tumor.....	36
2.3.3 O Gene <i>TP53</i> .....	38
3.Objetivo.....	40
3.1 Objetivo Geral.....	40
3.2 Objetivos Específicos.....	40
4. Materiais e Métodos.....	41
4.1 Amostra.....	41
4.2 Microdissecção dos tecidos incluídos em parafina para o estudo da LOH.....	44
4.3 Extração de DNA dos tecidos parafinados.....	46
4.4 Extração de DNA dos tecidos frescos.....	46
4.5 Avaliação da LOH.....	47
4.6 Sequenciamento direto dos éxons do <i>TP53</i> .....	50
4.7 Reações de imunohistoquímica.....	52
4.8 Avaliação da imunohistoquímica.....	53
4.9 Análise estatística.....	53
5. Resultados.....	55
5.1 Queilite Actínica.....	55
5.1.2 Análise da Imunohistoquímica.....	56
5.1.3 Dados Moleculares da LOH nos casos de Queilite Actínica.....	57
5.2 Carcinoma de células escamosas de lábio.....	61

5.2.2 Análise da Imunohistoquímica .....	61
5.2.3 Dados Moleculares da LOH nos casos de CCEL.....	63
5.3 Comparações dos resultados de QA e CCEL .....	65
5.4 Resultados do sequenciamento dos Éxons do P53 .....	67
5.4.1 Amostras congeladas .....	67
5.4.2 Amostras em parafina.....	69
6. Discussão .....	73
7. Conclusões.....	82
8. Referências.....	83
Anexo I – Termo de aprovação do COEP .....	97
Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. ....	100
Apêndice 1 .....	101
Apêndice 2.....	103
Apêndice 3.....	105
Apêndice 4.....	106
Apêndice 5.....	110
Apêndice 6 – Artigo submetido a revista Tumor Biology.....	111

## 1. Introdução

O lábio é uma região em que pode ocorrer o desenvolvimento de neoplasias. O carcinoma de células escamosas de lábio (CCEL) é uma neoplasia epitelial originada no vermelhão dos lábios. Ele corresponde a aproximadamente 15% de todas as neoplasias do segmento cabeça e pescoço e a 25% de todos os tumores da cavidade bucal. Cerca de 80% dos carcinomas do lábio acometem o lábio inferior, 5%-8% o lábio superior e 7%-15% encontram-se em comissuras (LUNA-ORTIZ *et al.*, 2004; SALGARELLI *et al.*, 2005; SUGERMAN; SAVAGE, 2002). Em um recente estudo brasileiro, as taxas de incidência de CCEL foram de 11% de todos os carcinomas de cavidade bucal e de 3,8% de todos os tumores do trato aero digestivo superior (SOUZA *et al.*, 2011).

O CCEL é uma lesão que ocorre com maior frequência em indivíduos do sexo masculino (80% a 90% dos casos), acometendo principalmente trabalhadores com histórico de exposição solar crônica (LUNA-ORTIZ *et al.*, 2004; POGODA; PRESTON-MARTIN, 1996).

Diversos fatores ambientais têm sido associados à etiopatogênese do CCEL, no entanto, os mecanismos de carcinogênese relacionados ao CCEL não parecem estar limitados a um único agente, mas a um complexo processo de interações entre fatores de risco. Os raios ultravioleta (UV) da radiação solar são importantes fatores modificadores do DNA. A proliferação das células que sofreram danos em seu DNA pode seguir alguns caminhos: o dano é reparado e a célula assume a sua função normal; a divisão celular prossegue com o modelo de DNA alterado; ou a célula sofre apoptose e é eliminada do tecido. Porém, a exposição crônica aos raios UV pode ocasionar o acúmulo de danos ao DNA, levando a célula alterada a estimular o seu próprio crescimento, resistir aos sinais inibitórios de crescimento, não entrar em apoptose, estimular a angiogênese e a

multiplicação celular, e, por fim, metastatizar para sítios distantes do tumor inicial (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Embora vários estudos tenham sido feitos no intuito de elucidar a patogênese do CCEL, os mecanismos moleculares envolvidos na ocorrência dessa neoplasia necessitam ser esclarecidos.

Muitas vezes, o CCEL pode ser precedido pela queilite actínica (QA), uma lesão que normalmente se apresenta em placa branco-avermelhada com áreas ulcerativas, e, às vezes, em forma de crosta que acomete parte ou todo vermelhão do lábio. A QA é caracterizada histopatologicamente por uma hiperqueratose, com ou sem displasia epitelial, degeneração basofílica do colágeno (elastose solar), associada ou não a infiltrado inflamatório. A QA acomete principalmente homens a partir da quinta década de vida, e está diretamente relacionada com exposição crônica à luz solar. É considerada uma lesão cancerizável, embora não existam dados concisos na literatura sobre a sua taxa de transformação maligna (DUFRESNE; CURLIN, 1997; VAN DER WAAL, 2009).

Estudos de avaliação da perda de heterozigosidade (*loss of heterozigosity* - LOH) em carcinoma de células escamosas intrabucal (CCEB) e do trato aero digestivo superior, identificaram LOH nas regiões 3p, 4q, 5q, 8p21–23, 11q13, 11q23, 13q, 14q, 17p, 18q, e 22q (GLAVAC *et al.*, 2003; LEE *et al.*, 2010; NG *et al.*, 2000).

O gene *TP53* caracteriza-se como um gene supressor de tumor, localizado no braço curto do cromossomo 17 (LEVINE; MOMAND; FINLAY, 1991; MAY; MAY, 1999) e codifica a proteína p53, (CRUZ *et al.*, 2000; SHIN *et al.*, 1994). O *TP53* é o gene mais frequentemente mutado em cânceres humanos e tem um papel fundamental na regulação do ciclo celular, sendo chamado de “guardião do genoma” (LANE, 1992).

Não foram encontrados estudos na literatura que demonstrassem a presença de LOH nas regiões 9p, 9q e 17q, ou mutações genéticas do *TP53* nas lesões de CCEL e QA.

Levando em consideração que essas lesões têm fatores de risco diferentes do CCE intrabucal, é de grande importância entender essas alterações, suas associações com os fatores clinicopatológicos e buscar marcadores genéticos que possam prever o comportamento clínico da QA e CCEL.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1. Queilite Actínica

#### 2.1.1 Sinonímias, breve histórico e conceito

A QA, também conhecida como queilose solar, ceratose solar, ceratose actínica ou queilose actínica, é um termo clínico para uma lesão ulcerativa, às vezes com formação de crosta que acomete parte ou todo o vermelhão do lábio (VAN DER WAAL, 2009). A palavra “queilite” vem do grego “keilos” e está relacionada à inflamação do lábio; O termo “actínica” vem do grego “Aktis” que significa raio (BENTLEY; BARANKIN; LAUZON, 2003). Portanto, o termo Queilite actínica parece ser o mais apropriado para denominar a lesão (KAUGARS *et al.*, 1999).

Um dos primeiros artigos a tentar elucidar a causa da QA foi publicado em 1923 por Ayres, que relata cinco casos de pacientes de regiões quentes e secas da Califórnia, que trabalhavam sob o sol constante e apresentavam lesões no lábio. Essas lesões eram caracterizadas por uma inflamação crônica com ulceração, localizada especialmente no lábio inferior, e ocorria com frequência nos meses de verão (AYRES, 1923). Foi o primeiro autor a levantar a hipótese de a causa da QA estar associada à radiação solar.

Desde então vários estudos foram conduzidos para melhor elucidar a etiopatogênese, prevalência, perfil clínico, alterações clínicas e moleculares dessa doença. Atualmente a QA é conceituada como uma alteração que se dá no vermelhão labial, potencialmente maligna, causada pela exposição crônica aos raios solares, que pode apresentar displasia em sua histopatologia (MORTAZAVI; BAHARVAND; MEHDIPOUR, 2014; PIÑERA-MARQUES *et al.*, 2010; YARDIMCI *et al.*, 2014).

### 2.1.2 Aspectos epidemiológicos, etiopatológicos e clínicos da QA

Clinicamente, a QA pode se apresentar em duas formas principais: a aguda e a crônica. A forma aguda não será abordada neste estudo, uma vez que é uma entidade distinta e sem potencial de transformação maligna.

A forma crônica geralmente se manifesta como uma discreta elevação, podendo envolver toda extensão do lábio inferior até a comissura labial. Observam-se alterações de cor, frequentemente de aspecto pálido, lustroso, com superfície macia e perda da plasticidade usual do lábio, sendo que erosões e ulcerações podem estar presentes (figura 1). Estudos demonstraram que o lábio inferior pode ser até 10 vezes mais afetado que o superior, devido principalmente à sua posição anatômica, estando mais diretamente exposto à radiação UV (KAUGARS *et al.*, 1999; MAIN; PAVONE, 1994; MANGANARO; WILL; POULOS, 1997). A QA afeta predominantemente homens, leucodermas, a partir da sexta década de vida, variando na incidência entre os 40 e 80 anos. Para a confirmação do diagnóstico, faz-se necessário biópsia do local da lesão, inclusive para excluir a presença do CCEL (KAUGARS *et al.*, 1999).



**Figura 1: Aspecto clínico da QA em lábio inferior:** lesões leucoplásicas distribuídas por todo o lábio inferior, com perda do limite do vermelhão do lábio e algumas áreas eritoplásticas. Fonte: [http://www.regionalderm.com/Regional\\_Derm/Afiles/actinic\\_cheilitis.html](http://www.regionalderm.com/Regional_Derm/Afiles/actinic_cheilitis.html)



Silva *et al.*, (2006), em seu estudo com pescadores de Santa Catarina – Brasil, verificaram que 43% da amostra (n total de 111 pescadores) apresentavam QA, e que todas as lesões envolviam o lábio inferior. O grupo de pescadores que tinha menos de 15 anos de exposição diária ao sol, com média de oito horas por dia, apresentava menor número de casos de QA do que o grupo com mais de 45 anos de exposição, o que demonstrou a influência do tempo de exposição ao UV da radiação solar no desenvolvimento de QA. A média de idade dos pacientes examinados foi de 47 anos, sendo que 93% destes eram leucodermas e somente 7% melanodermas (SILVA *et al.*, 2006).

Em outro estudo de 2008, com uma amostra de 38 pacientes com QA, 72% eram do sexo masculino, 75% tinham idade superior a 40 anos, 93% eram leucoderma e 72% eram fumantes. Clinicamente, todos os pacientes apresentaram lesões multifocais (CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008).

No estudo de Marques (2010), foram analisados 125 pescadores com um histórico de exposição crônica à luz solar, moradores em Florianópolis, Santa Catarina – Brasil. A média de exposição dos pacientes foi de 32 anos de 7,7 horas por dia e 92% dos pescadores não utilizavam nenhum tipo de proteção à luz solar. Os resultados mostraram que dos 125 pescadores avaliados, 12 já apresentavam alterações displásicas na avaliação histopatológica da lesão e 4 pacientes já apresentavam CCEL (PIÑERA-MARQUES *et al.*, 2010).

No estudo de Martins-Filho (2011), a prevalência de QA em agricultores nas áreas do semiárido brasileiro foi de 16,7% dos casos. A doença foi prevalente nos indivíduos do sexo masculino, de pele clara e com idade acima de 50 anos. Dois casos foram diagnosticados como carcinoma de células escamosas (MARTINS-FILHO; DA SILVA; PIVA, 2011). Esses dados e o dos estudos citados acima demonstram a

necessidade de se fazer a biópsia incisional para descartar a presença do CCEL(MARTINS-FILHO *et al.*, 2011).

A radiação solar é o principal agente etiológico da QA. Outros fatores etiológicos têm sido implicados no risco para a QA, tais como hábitos alimentares, uso do tabaco e predisposição genética. Exposição ao fumo, poluentes e o processo natural de envelhecimento da pele contribuem para a formação de radicais livres que estimulam o processo inflamatório na pele. A evidência científica existente, no entanto, ainda é fraca para sustentar a associação de tais fatores e a etiopatogênese da doença (BENTLEY *et al.*, 2003; DOUGLASS; GAMMON, 1984; KAUGARS *et al.*, 1999; LINDQVIST; TEPPPO, 1978; MANGANARO *et al.*, 1997; OLIVEIRA ALVES *et al.*, 2014).

O diagnóstico da QA é baseado nos achados clínicos e histopatológicos. A QA apresenta-se no vermelhão dos lábios como áreas leucoplásicas associadas a áreas eritematosas, eventualmente erosivas, ulceradas ou com crostas, nas quais pode ocorrer sangramento. Inicialmente, os lábios apresentam-se ásperos e ressecados, depois aparecem estrias ou fissuras perpendiculares no limite pele-vermelhão. Nos casos mais avançados, é comum o edema difuso do lábio e perda do limite pele-vermelhão (DE OLIVEIRA RIBEIRO; DA SILVA; MARTINS-FILHO, 2014; MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004; OCHSENIUS *et al.*, 2003).

Alguns autores são unânimes em afirmar que, nos casos em que há alterações histopatológicas moderadas a graves, na biópsia incisional, há a indicação de remoção cirúrgica da lesão (DUFRESNE; CURLIN, 1997; KIM; SONG; KIM, 2013; MORTAZAVI *et al.*, 2014; SHAH; DOHERTY; ROSEN, 2010). Outros afirmam que, como não há correlação entre a aparência clínica e a agressividade histológica, a biópsia incisional é indicada em todos os casos, pois há risco de malignização (ABREU *et al.*, 2006; BAKER, 1980). Esse risco foi demonstrado por Markpoulos *et al.* (2004), em um

estudo com 65 casos de QA, identificou onze indivíduos que já apresentavam, histopatologicamente, carcinomas de células escamosas (MARKOPOULOS *et al.*, 2004).

As condutas terapêuticas para a QA visam tratar a doença em si e impedir que ela sofra transformação maligna. Nos quadros em que a histologia não demonstra atipia epitelial, pode-se optar pelo uso de protetores labiais e outras medidas que minimizem o índice de exposição solar. Alguns casos podem apresentar regressão espontânea e a grande maioria requer excisão cirúrgica da lesão (MAIN; PAVONE, 1994). Não existem estudos na literatura que mostram evidências de formação de campo de cancerização em lábio, como ocorre em leucoplasias bucais e carcinomas intrabucais, embora a presença do campo de cancerização seja provável.

### **2.1.3 Características Histopatológicas**

A QA crônica apresenta um conjunto de alterações histológicas. O aspecto histopatológico da lesão pode variar desde uma hiperqueratose sem displasia epitelial, até quadros de displasia epitelial severa. São componentes desse quadro a degeneração basofílica do colágeno (elastose solar) e, frequentemente, infiltrado inflamatório. A displasia epitelial pode ser restrita ao terço profundo ou médio do epitélio, envolver toda sua espessura (carcinoma *in situ*), e em casos em que haja áreas de rompimento da membrana basal, o diagnóstico passa a ser de um carcinoma de células escamosas (CCEL) (DE SANTANA SARMENTO *et al.*, 2014; KAUGARS *et al.*, 1999).

Os pacientes com QA e CCEL possuem perfis semelhantes, o que reforça os relatos da literatura que consideram a QA como lesão cancerizável (ABREU *et al.*, 2006; BAKER, 1980; CAVALCANTE *et al.*, 2008). Além disso, os padrões morfológicos do CCEL sugerem uma evolução da QA para o CCEL. Porém, em relação à taxa de

transformação maligna, não existem dados conclusivos na literatura (VAN DER WAAL, 2009).

## **2.2 Carcinoma de Células Escamosas**

### **2.2.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos do Carcinoma de Células Escamosas de Lábio**

O Carcinoma de Células Escamosas de Lábio (CCEL) é uma neoplasia epitelial maligna que acomete o vermelhão dos lábios. Pode originar-se na semi-mucosa/mucosa sem alterações (*de novo*) assim como a partir de lesões cancerizáveis como a QA. O CCEL corresponde a 30% dos carcinomas de cavidade oral e a 2% de todas as neoplasias malignas (SALGARELLI *et al.*, 2005).

Estimativas da incidência de câncer para 2014 no Brasil apontaram ser o câncer de boca (incluindo lábio, cavidade bucal e orofaringe) como o quinto mais frequente entre homens (com 11280 novos casos estimados) e o 11º entre mulheres (com 4010 novos casos estimados). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer da cavidade oral em homens é o quarto mais frequente nas regiões Sudeste (15,48/ 100 mil) e Nordeste (7,16/ 100 mil). Na região Centro-Oeste, é o quinto (8,18/ 100 mil). Nas regiões Sul (15,21/ 100 mil) e Norte (3,21/ 100 mil) o sexto. Para as mulheres, é o nono mais frequente nas regiões Sudeste (4,88/ 100 mil) e Nordeste (3,72/ 100 mil). Na região Norte (1,60/ 100 mil), ocupa a 11ª posição. Na região Centro-Oeste (3,30/ 100 mil), é o 12º mais frequente e, na região Sul (3,09/ 100 mil), o 15º. A última estimativa mundial apontou que ocorreriam cerca de 300 mil casos novos e 145 mil óbitos, para o ano de 2012, por câncer de boca e lábio (INCA, 2014). Vale ressaltar que nessas estimativas não é possível obter dados apenas dos CCEL, uma vez que estão agrupados com o CCE intrabucal.

Em um estudo brasileiro de 2006, que traçou o perfil da incidência de pacientes com CCE intrabucal no Brasil, os autores relataram que o lábio inferior foi a terceira localização (17,9% dos casos) mais comum do CCE intrabucal (OLIVEIRA; RIBEIRO-SILVA; ZUCOLOTO, 2006).

Há inúmeros relatos na literatura que demonstram discrepâncias nas incidências do CCEL em diferentes áreas geográficas. Cidades litorâneas em que há grande exposição solar durante a maioria dos dias do ano têm uma alta taxa de CCEL. Isso pode ser parcialmente explicado pelas variações entre os grupos estudados no que se refere à exposição aos fatores associados, como exposição solar, uso de protetores labiais, consumo de tabaco e bebida alcoólica (LA VECCHIA *et al.*, 1997; LINDQVIST; TEPPPO, 1978; MOORE *et al.*, 1999; OCHSENIUS *et al.*, 2003; SUGERMAN; SAVAGE, 2002). As maiores incidências mundiais de câncer de lábio são relatadas na população branca do Canadá e Austrália. Acima de 50% dos cânceres bucais na Austrália são localizados no lábio (SUGERMAN; SAVAGE, 2002). A Espanha e o Irã têm o CCEL como uma das lesões malignas mais comuns da boca (PEREA-MILLA LOPEZ *et al.*, 2003; SARGERAN *et al.*, 2009).

O CCEL ocorre principalmente em homens com histórico de longa exposição solar durante a vida (LINDQVIST; TEPPPO, 1978). A alta incidência de CCEL parece estar associada a profissões em que os trabalhadores se expõem cronicamente a altos níveis de incidência solar, tais como fazendeiros, marinheiros, pescadores, trabalhadores da construção civil, garis e trabalhadores rurais (LUNA-ORTIZ *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2011; SUGERMAN; SAVAGE, 2002).

Classicamente, o CCEL apresenta-se clinicamente como uma úlcera de bordas elevadas e endurecidas, mal delimitada, podendo ter áreas leucoplásicas ou eritroplásicas no vermelhão labial (Figura 1). Embora a forma clínica ulcerada seja a mais frequente,

outras apresentações da doença podem ser vistas, como lesões exofíticas, com margens mal delimitadas (HASSON, 2008).



**Figura 2: Aspecto clínico do CCEL em lábio inferior:** Lesão ulcerada, de bordas endurecidas e limites imprecisos, acometendo grande extensão do lábio inferior.

### 2.2.2 Etiopatogênese do CCEL

Vários fatores ambientais foram citados na tentativa de elucidar a etiopatogênese do CCEL, no entanto, tal carcinogênese não parece ser limitada a um único agente, mas a um complexo processo de interações entre fatores de risco. Diferentemente dos casos de carcinoma de células escamosas intrabucal, cujo principal fator de risco conhecido é o uso do tabaco, estudos mostram que a etiologia do CCEL está altamente relacionada à exposição crônica aos raios UV (LA VECCHIA *et al.*, 1997; PARKIN, 2001; PATIL; MAHESHWARI, 2014)

### 2.2.3 Prognóstico e tratamento do CCEL

O CCEL apresenta prognóstico mais favorável que do CCE intrabucal. Esse fato ocorre, talvez por a neoplasia se localizar em uma área exposta, de fácil diagnóstico, o que facilita o diagnóstico precoce da lesão. Quando comparado ao CCE em pele, apresenta maior possibilidade de desenvolver metástase cervical, com taxas variando de 3 a 20% (RODOLICO *et al.*, 2004). As lesões labiais menores que 2 cm têm bom prognóstico, apresentam evolução lenta, baixo grau de invasão aos tecidos adjacentes e

de disseminação linfonodal, e constituem exceção ao prognóstico dos demais cânceres bucais (ABREU *et al.*, 2006; RENA *et al.*, 2014).

Um estudo de 1995 mostrou que a taxa de sobrevida de cinco anos é significativamente influenciada pela diferenciação histológica do tumor primário. Portanto, 91% dos pacientes que apresentam tumores bem diferenciados sobrevivem mais que cinco anos. Para tumores moderadamente e pobremente diferenciados, a prevalência muda para 75% e 39%, respectivamente (ANTONIADES *et al.*, 1995).

Metástases a distância são mais raras, variando de 0,5% - 2% e, quando ocorrem, são mais frequentes em pulmão e fígado. O risco de metástase a distância está diretamente relacionado ao estágio avançado do tumor e a recorrência locorregional (BETKA, 2001; VAHTSEVANOS *et al.*, 2007).

O tratamento de escolha para o CCEL é a remoção cirúrgica com margens de segurança, porém a associação com a radioterapia pós-operatória é a mais indicada em casos avançados. Associado a essas condutas, pode ser realizado esvaziamento cervical seletivo, mesmo na ausência de metástases clinicamente identificáveis, pois a taxa de metástases ocultas é superior a 30% (KUMAR *et al.*, 2014; SALGARELLI *et al.*, 2005).

### **2.2.3.1 Sistema TNM para os tumores malignos do lábio**

O Sistema TNM para o estadiamento dos tumores malignos foi desenvolvido na década de 50 pela União Internacional do controle de Câncer (IUCC). Em 1950, um comitê nomeado pela UICC determinou a nomenclatura e a classificação para os tumores, como base para seu trabalho na classificação do estágio clínico, as definições gerais de extensão local dos tumores malignos sugeridas pelo Sub-Comitê de Registros de Casos de Câncer e Apresentação Estatística, da OMS. Em 1953, o Comitê da UICC, em reunião com várias comissões internacionais de tratamento do câncer, fez um acordo no que diz

respeito à técnica geral de classificação pela extensão anatômica da doença, usando o Sistema TNM (KREPPEL *et al.*, 2010).

A edição atual é a 6<sup>a</sup>, feita no ano de 2002, e é amplamente utilizada no mundo inteiro como importante preditor de prognóstico. Abaixo segue a atual classificação para tumores de lábio (KREPPEL *et al.*, 2010).

### **T - Tumor Primário**

- TX O tumor primário não pode ser avaliado
- T0 Não há evidência de tumor primário
- Tis Carcinoma in situ
- T1 Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
- T2 Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
- T3 Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
- T4a (Lábio) Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz)

### **N - Linfonodos Regionais**

- NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
- N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais
- N1 Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
- N2 Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
- N2a Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão



- N2b Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
- N2c Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
- N3 Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão

#### **M - Metástase a Distância**

- MX A presença de metástase a distância não pode ser avaliada
- M0 Ausência de metástase a distância
- M1 Metástase a distância

#### **2.2.4 Características histopatológicas**

O diagnóstico do CCEL é realizado através de um exame histopatológico, conjuntamente com os dados clínicos, a partir de um fragmento representativo do tumor mediante biópsia incisional do tecido neoplásico. É caracterizado histologicamente por ilhas e cordões infiltrativos de células epiteliais malignas, que mostram diferenciação em direção a uma morfologia escamosa (NEVILLE; DAY, 2002).

As células do CCEL podem apresentar alterações morfológicas caracterizadas por nucléolos proeminentes, hipercromatismo e pleomorfismo nuclear, alteração na relação núcleo/citoplasma, eosinofilia citoplasmática, disceratose, pleomorfismo celular, número de mitoses elevado e mitoses atípicas. Quando as células mantêm a capacidade de produção de queratina, formam-se coleções dessa proteína no interior de ilhotas tumorais, denominadas pérolas de queratina. Alterações no estroma como desmoplasia, angiogênese e infiltrado inflamatório de intensidade variada também podem ser observadas (CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010; NEVILLE; DAY, 2002).

## 2.3 Carcinogênese

A carcinogênese é um processo complexo que envolve alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em diversos processos relacionados, envolvendo o controle do ciclo celular, a apoptose, a diferenciação, a senescência e a angiogênese, além da motilidade celular e capacidade migratória. Várias são as teorias desse processo carcinogênico, e a mais difundida é a teoria da mutação somática. Basicamente uma ou um grupo de células sofre mutações genéticas tornando as potencialmente capazes de se multiplicarem de modo autônomo, escapando de todos os mecanismos de proteção do DNA. A partir daí, ocorre a expansão clonal dessas células, a qual leva a um grande acúmulo de mutações genéticas e à transformação das mesmas em neoplasias (HANAHAN; WEINBERG, 2000;2011; PITOT, 2001).

Dentre os vários agentes promotores dessas alterações genéticas, a exposição à radiação ultravioleta é o principal fator associado ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas de lábio, esse e alguns processos relacionados à alteração da proteína do gene *TP53* serão discutidos a seguir (DE VISSCHER *et al.*, 2002).

### 2.3.1 A Radiação UV

A radiação ultravioleta natural, proveniente do sol, é dividida conforme o comprimento de onda que emite. Essa radiação é classificada em UVA (320-400nm), UVB (290-320nm) e UVC (200-290nm) (HUSSEIN, 2005; LINCOLN, 2000). A radiação UVC é quase completamente absorvida pela camada de ozônio na atmosfera terrestre, e não traz dano a vida terrestre. Já as radiações UVA e UVB não são completamente absorvidas pela camada de ozônio e afetam diversas moléculas da pele que absorvem a radiação UV e sofrem alterações químicas. Essa absorção pode causar lesões como inflamação, eritema, queimaduras e danos ao DNA, que eventualmente

podem levar ao câncer (HUSSEIN, 2005; LINCOLN, 2000; MELNIKOVA; ANANTHASWAMY, 2005). Ambos os raios UVA e UVB podem contribuir para o envelhecimento da pele, danificando colágeno, quebrando a vitamina A, levando a uma imunossupressão local e por ionização, liberando radicais de oxigênio que podem danificar DNA das células (LINCOLN, 2000).

O tipo de lesão causada pela radiação UV varia dependendo do seu comprimento de onda. Os efeitos deletérios da UVA acontecem através da geração de espécies reativas de oxigênio, que provocam uma diminuição na habilidade das células em produzir adenosina trifosfato (ATP), levando a um menor fornecimento de energia para as mesmas. Essas moléculas produzem ligações cruzadas de DNA - proteína, quebras de fita única e alterações de bases no DNA (LINCOLN, 2000).

Já os raios UVB causam alterações celulares, devido à grande quantidade de energia que é levada ao estrato córneo e às camadas mais superficiais da epiderme. Há a formação de dímeros de pirimidina-ciclobutanos (CPD) e fotoprodutos 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4PP)(CLINGEN *et al.*, 1995; MITCHELL, 1988; RAHN, 1966). Essas duas lesões são formadas exclusivamente em resíduos de pirimidina, que constituem regiões altamente susceptíveis a mutações e lesões no DNA, que podem dar lugar a mutações específicas que compreendem a transição C→T e CC→ TT nas sequências dipirimidínicas (LINCOLN, 2000; SINHA, R. P.; HADER, 2002).

As bases do DNA contêm estruturas em anel com abundantes ligações conjugadas, o que faz o DNA ser um importante absorvedor de radiação UV nas células. (DE GRUIJL, 1999). Acredita-se que raios UV possam provocar o rompimento da dupla hélice do DNA, bloqueando a replicação e a transcrição, causando vários danos, entre eles mutações no gene supressor de tumor *TP53*, com danos ao mecanismo de destruição, reparo e morte celular normal (SMITH *et al.*, 2000). A proteína p53 mutada está presente

em mais de 50% de todos os tumores humanos, sugerindo que a inativação, tanto dessa proteína quanto do gene, realiza um papel importante no fenômeno da gênese tumoral (DARNTON, 1998; LEVINE *et al.*, 1991).

### 2.3.2 Perda de heterozigidade em regiões de genes supressores de tumor

A perda de heterozigidade (LOH) é uma alteração genética, na qual há perda de um ou ambos alelos de uma determinada região cromossômica específica presente em células normais. Essas alterações podem vir de fenômenos que podem causar uma diferença entre o tecido normal e tumoral do indivíduo (HAPPLE, 1999; KNUDSON, 1971).

O mecanismo genético da LOH foi inicialmente estudado em 1929, pelo zoólogo americano John Patterson, para explicar o aparecimento de manchas mutantes induzidas por Raios X em *Drosophila melanogaster*. Em um embrião heterozigoto para uma mutação recessiva que afetava a cor dos olhos, a aplicação de raios X induzia a perda de um alelo selvagem em células somáticas, resultando em uma homozigidade ou hemizigidade para o alelo mutante, causando uma mancha mosaica no fundo dos olhos da *Drosophila*. Analogamente, essa perda alélica causava também uma dupla mancha (HAPPLE, 1999).

Em 1973, Comings levantou a hipótese de que o mecanismo da LOH poderia ser um passo crucial para o desenvolvimento de neoplasias humanas. Ainda na década de 1970, em seus estudos, Knudson mostrou que alterações genéticas, como mutações, podem ser um dos passos importantes para a completa perda de um gene supressor de tumor. De acordo com esse modelo de supressão tumoral, conhecido como “*Two-hit*”, a inativação de um gene supressor de tumor requer alterações genéticas nos dois alelos

(KNUDSON, 1971). Porém, novos estudos mostraram que a LOH é um evento que pode estar associado a um estado de haploinsuficiência gênica. Portanto, a perda ou inativação de apenas um único alelo pode ser um fator importante para o comprometimento funcional de um gene supressor de tumor, o que pode induzir ao câncer (BERGER; KNUDSON; PANDOLFI, 2011).

Genes supressores de tumor são um grupo de genes responsáveis pela codificação das proteínas que transmitem sinais negativos regulatórios do crescimento celular. Esses genes estão frequentemente envolvidos na regulação do ciclo celular, incluindo paradas do ciclo e apoptose. Diversos estudos mostraram que perdas somáticas em locus de genes supressores de tumor são capazes de alterar a expressão e função desses genes, resultando assim em uma susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer (LEE *et al.*, 2010; VERMA; TRIANTAFILLOU, 1998).

As regiões microssatélites são pequenas sequências repetitivas, altamente polimórficas na população e susceptíveis a erros durante a replicação do DNA (LI, Y.-C. *et al.*, 2004). Encontram-se distribuídos por todo o genoma humano, e algumas regiões cromossômicas como 3p, 9p, 11p, 17p são relatadas na literatura como deletadas em uma série de neoplasias como câncer de mama, pulmão, melanoma, carcinomas de cabeça e pescoço e ameloblastomas (FIELD *et al.*, 1995; MIGALDI *et al.*, 2008; ROWLEY *et al.*, 1996; SINHA, S. *et al.*, 2008). Nunes e colaboradores (2000) realizaram uma análise de microssatélites de células provenientes da cavidade bucal de pacientes com câncer de boca e orofaringe por citologia esfoliativa, e encontraram LOH em 84% das amostras. Novamente diferenças foram observadas dependendo do estágio do tumor. Estes autores sugeriram que a avaliação da LOH pode ser útil para o diagnóstico precoce e para o acompanhamento do paciente. Porém esse estudo utilizou o DNA extraído de raspado de

mucosa e a avaliação da LOH por intensidade das bandas na eletroforese, o que exige cautela na interpretação dos resultados (NUNES; KOWALSKI; SIMPSON, 2000).

Em outro estudo, foram identificadas alterações genéticas como a LOH em todas as lesões malignas da cavidade oral (SPAFFORD *et al.*, 2001). Por outro lado, nenhum dos pacientes saudáveis apresentou tais alterações, indicando a alta especificidade desses métodos. Estudos de avaliação da LOH em CCE intrabucal e de cabeça e pescoço identificaram perdas cromossômicas nas regiões 3p, 4q, 5q, 8p21–23, 11q13, 11q23, 13q, 14q, 17p, 18q, e 22q (AHMED; IDRIS; IBRAHIM, 2003; LEE *et al.*, 2010). A LOH nessas regiões cromossômicas, que apresentam alterações no carcinoma de células escamosas de boca, ainda não foi investigada em CCEL e em QA.

### **2.3.3 O Gene *TP53***

O *TP53* é um gene supressor de tumor, localizado no braço curto do cromossomo 17p, composto por onze éxons, sendo que o primeiro deles não é codificante e apresenta um primeiro íntron longo (10 kb). Apresenta uma região central hidrofóbica, codificada pelos éxons 5 a 8 (aa 110-296), flanqueados por regiões hidrofílicas: uma região N-terminal ácida e uma C-terminal básica. A sequência codificante contém cinco domínios, cada um deles é responsável por funções específicas (LEVINE *et al.*, 1991; MAY; MAY, 1999).

O produto desse gene é uma fosfoproteína nuclear chamada p53, que apresenta um peso molecular aproximado de 53kD, e tem, ao todo, 393 aminoácidos. Entre as suas funções, a p53 atua bloqueando o ciclo celular entre as fases G1/S, permitindo a reparo de danos ocorridos no DNA (MAY; MAY, 1999).

A p53 possui uma meia-vida que varia entre 6 a 30 minutos, sendo difícil, portanto a sua detecção. Porém, mutações genéticas, defeitos na via de degradação e a ligação

dessa proteína com outras como as do vírus símio 40 (SV40) e papilomavirus humano (HPV) podem induzir a estabilidade metabólica da proteína, aumentando consideravelmente sua meia vida, e com isso, é possível a sua detecção nos tecidos neoplásicos. O stress celular também pode levar a estabilização da p53 (BONGERS *et al.*, 1995; NYLANDER; DABELSTEEN; HALL, 2000). A detecção da p53 por imunohistoquímica nesse momento pode ser detectada (CRUZ *et al.*, 2000; SHIN *et al.*, 1994).

O papel fundamental do *TP53* na regulação do ciclo celular, na apoptose e no reparo do DNA consagrou-o com a denominação de “guardião do genoma” (LANE, 1992). Mutações são as principais alterações verificadas na carcinogênese, no entanto, diversos outros mecanismos de inativação da p53 nas células cancerosas podem ocorrer.

O gene *TP53* é frequentemente inativado por mutações pontuais do tipo *missense*, (onde há alteração do aminoácido codificado pela troca da base nitrogenada). Podem ocorrer também mutações *nonsense* (mudam o código para um código de parada da leitura da proteína), silenciosas (onde a troca da base não altera o aminoácido ou essa troca ocorre na parte não codificante da proteína) e outros tipos de alterações (OLIVIER *et al.*, 2002; PETITJEAN *et al.*, 2007).

Foram descritas até hoje mais de 28 mil mutações diferentes do gene *TP53*, sendo que aproximadamente 75% são substituições de pares de bases e a maior parte ocorre em regiões exônicas localizadas no domínio de ligação ao DNA. Aproximadamente 30% das mutações de troca de sentido ocorrem em seis códons preferenciais (175, 245, 248, 273 e 282), ou “hot-spots”. Outras mutações foram descritas em mais de 200 diferentes códons (OLIVIER *et al.*, 2002; OLIVIER, MAGALI; HOLLSTEIN, MONICA; HAINAUT, PIERRE, 2010; PETITJEAN *et al.*, 2007).

### 3. Objetivo

#### 3.1 Objetivo Geral

Estudar a perda de heterozigossidade (LOH) em regiões cromossômicas que previamente demonstraram LOH em CCE intrabucal e de pele e mutações nos éxons do gene *TP53* em CCEL e QA.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a LOH nas regiões cromossômicas 9p, 9q e 17p em CCEL e QA utilizando os marcadores: D9S157, D9S162, D9S171, D9S287, AFM238WF2 e *TP53*.
- b) Avaliar a frequência de perda alélica (FAL) dos casos de CCEL e QA.
- c) Comparar o perfil de LOH entre CCEL e QA.
- d) Verificar se as amostras de CCEL em estágio mais avançado apresentam um perfil distinto de LOH.
- e) Investigar a expressão imunohistoquímica das proteínas p53 e ki-67 nos casos de QA e em CCEL.
- f) Testar a associação entre a LOH e a imunoexpressão em cada marcador
- g) Verificar a existência de mutações nos éxons do gene *TP53* nas lesões de CCEL e QA.



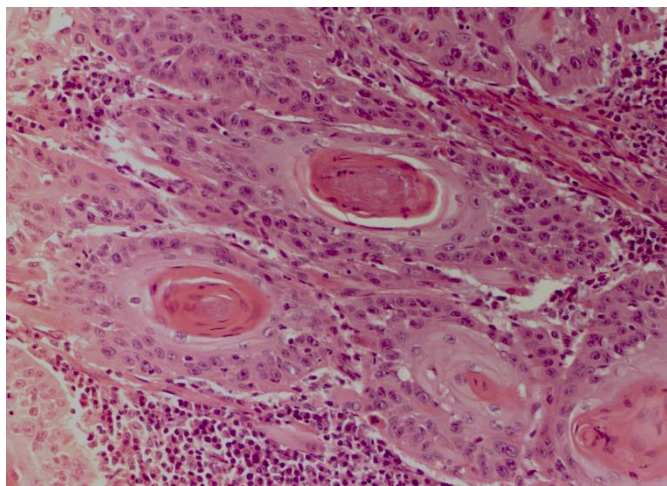
#### **4. Materiais e Métodos**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo I) sob o nº 99.057, de 19/09/2012 obedecendo à resolução brasileira do Conselho Nacional de Saúde CNS nº 466/12, que dispõe sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

##### **4.1 Amostra**

O presente trabalho consiste em um estudo transversal-retrospectivo com amostras fixadas e frescas de CCEL e QA. As amostras fixadas e incluídas em parafina foram obtidas a partir de uma revisão dos casos de pacientes acometidos por CCEL e QA, entre os anos de 2000 a 2014, nos laboratórios de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG e no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG. Após esse levantamento, foram separados somente os casos que continham os dados clínicos, o bloco de parafina e a lâmina histopatológica corada em hematoxilina e eosina (H&E) (figura 03).

Todos os tumores utilizados no estudo, parafinados ou congelados, tiveram suas lâminas em H&E revisadas por três patologistas bucais (R.S. Gomez, C.C. Gomes e V.F. Bernardes) para a confirmação do diagnóstico, sendo adotados os critérios da OMS (BARNES; ORGANIZATION; CANCER, 2005).



**Figura 3: Amostra histopatológica de uma amostra de CCEL do laboratório de Patologia Bucal da UFMG. Coloração H&E – Aumento 200x: Características histopatológicas do CCEL (ninhos de células neoplásicas caracterizados por células escamosas exibindo pleomorfismo celular e nuclear, núcleos hiper cromáticos e pérolas de queratina, circundados por infiltrado inflamatório mononuclear).**

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados para a escolha dos casos fixados em formol e incluídos em parafina

#### **Crítérios de Inclusão:**

1. Confirmação histopatológica do diagnóstico da lesão;
2. Bloco de parafina com tecido suficiente para realização da extração do DNA sem que houvesse dano ou perda de material para posteriores avaliações e ou pesquisas;
3. Presença de tecido não epitelial morfológicamente normal e de tecido epitelial morfológicamente alterado nos fragmentos;
4. Dados básicos nas fichas clínicas dos pacientes (como nome, idade, gênero);
5. Pacientes maiores de 18 anos.

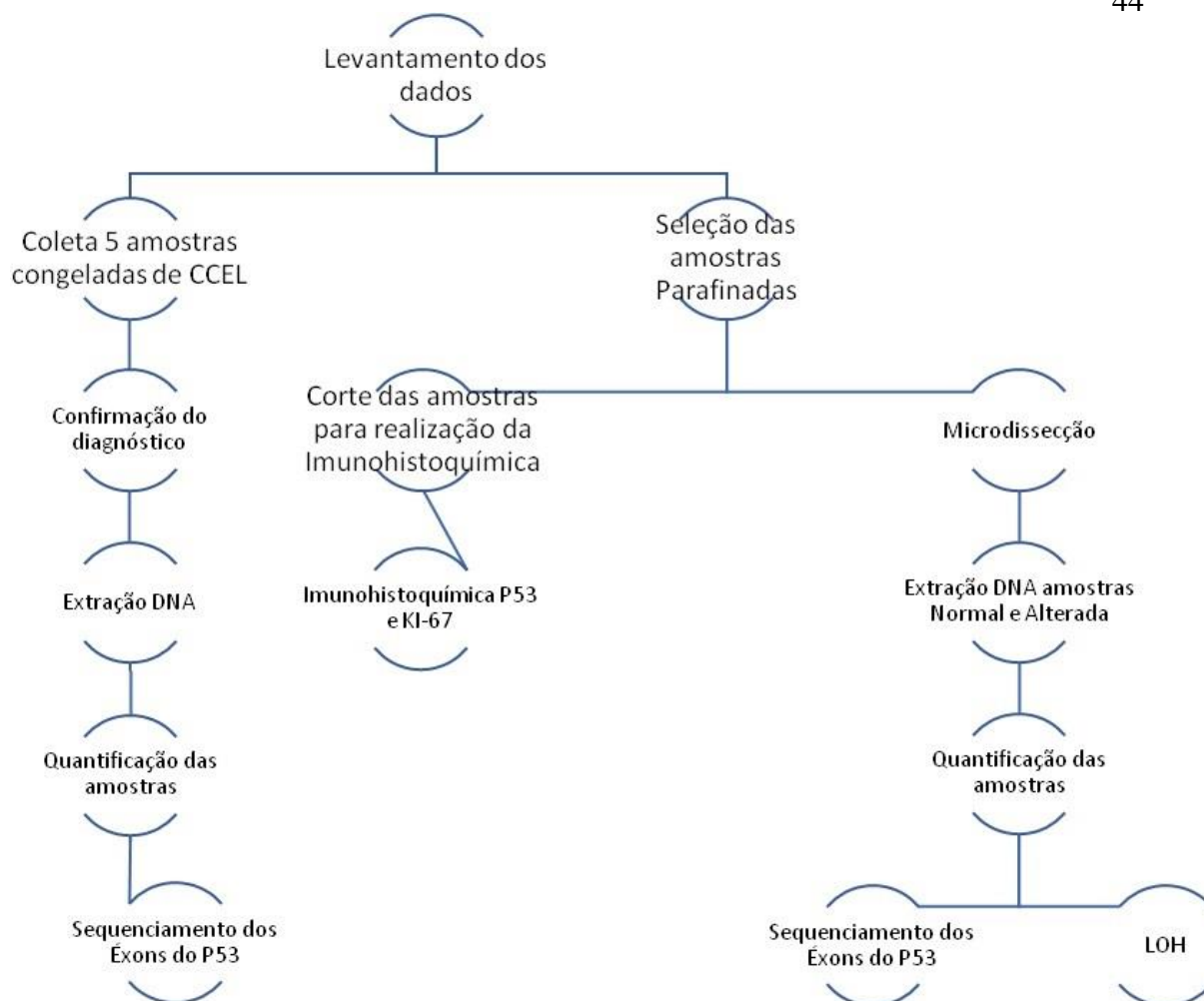
Após essa seleção, 17 casos de CCEL e 16 casos de QA foram obtidos. Os tumores congelados foram coletados durante a biópsia excisional das lesões. Foram incluídos ao

todo, 5 amostras de CCEL, onde foram obtidos os dados clínicos (sexo, idade e estadiamento TNM), bem como coletadas amostras de tecido tumoral. O estadiamento clínico das lesões foi realizado no ambulatório, seguindo os padrões do TNM (KREPPEL *et al.*, 2010).

Os tecidos frescos foram obtidos durante o procedimento cirúrgico da remoção total da lesão (após diagnóstico obtido por biópsia incisional). Foram coletados do mesmo paciente 2 fragmentos do tumor, sendo um acondicionado em formol tamponado a 10%, para confirmação do diagnóstico histopatológico de CCEL, e o outro fragmento foi acondicionado em RNA-Holder (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) e mantido no meio por 24 h a 4 °C, e em seguida, guardados em nitrogênio líquido. Os tecidos eram acondicionados, o mais rapidamente possível, nessas soluções para preservação dos ácidos nucleicos e evitar a degradação (MELO *et al.*, 2010).

Assim, um total de 5 casos de CCEL congelados foram incluídos no estudo para as posteriores análises de sequenciamento gênico. Os critérios de inclusão para os tumores frescos utilizados foram tumores com diagnóstico histopatológico de CCEL e os dados clínicos disponíveis nas fichas.

Para os tumores frescos de CCEL (N=5) utilizados no estudo, foi obtido termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) de todos os pacientes envolvidos. Já nos casos parafinados de CCEL e QA, por se tratar de uma revisão de arquivo, foi feita uma tentativa de contato com todos os pacientes para assinarem o TCLE (Anexo II). Entretanto, não foi possível a localização de todos os pacientes, por motivos como, mudança de endereço e telefone de contato, e óbito de alguns dos pacientes. Entretanto, todos os esforços foram feitos para que isso fosse minimizado. A seguir (figura 4), é possível observar o fluxograma do desenho do estudo.



**Figura 4: Delineamento e seqüência de eventos para obtenção e processamento das amostras do estudo.**

#### 4.2 Microdissecção dos tecidos incluídos em parafina para o estudo da LOH

Confirmados os diagnósticos das lesões de CCEL e QA, foram identificadas e marcadas regiões normais (tecido conjuntivo, muscular, glândulas salivares e tecido adiposo) e tecido epitelial sabidamente alterado por meio de microscopia óptica de luz (100X) nas lâminas coradas em H&E. Após essa identificação, dos 33 casos de CCEL e QA, 29 foram selecionados para a microdissecção manual e outros quatro foram selecionados para a realização da microdissecção a laser (todos de CCEL). Esses quatro casos foram selecionados para a microdissecção a laser por apresentarem uma alta quantidade de tecido inflamatório nas áreas tumorais e / ou, um alto grau de invasão de

tecido tumoral no tecido conjuntivo adjacente, dificultando assim, a realização da microdissecção manual. Não foi realizada a microdissecção a laser para todos os casos, já que a quantidade de DNA obtida através dessa técnica é bastante limitada, além do alto custo dos insumos necessários para a realização dessa pesquisa e da demanda de tempo.

**Tabela 1: Descrição da procedência e do tipo de material utilizado na pesquisa.**

<b>Amostras</b>	<b>Procedência</b>	<b>Tipo de tecido</b>	<b>Microdissecção</b>
Diagnóstico: CCEL			
#1	FO - UFMG	Parafina	Manual
#2	FO - UFMG	Parafina	Manual
#3	FO - UFMG	Parafina	Manual
#4	FO - UFMG	Parafina	Manual
#5	FO - UFMG	Parafina	Manual
#6	FO - UFMG	Parafina	Manual
#7	FO - UFMG	Parafina	Laser
#8	FO - UFMG	Parafina	Laser
#9	FO - UFMG	Parafina	Manual
#10	FO - UFMG	Parafina	Laser
#11	FM - UFMG	Parafina	Manual
#12	FO - UFMG	Parafina	Manual
#13	FM - UFMG	Parafina	Manual
#14	FO - UFMG	Parafina	Laser
#15	FM - UFMG	Parafina	Manual
#16	FM - UFMG	Parafina	Manual
#17	FM - UFMG	Parafina	Manual
Diagnóstico: QA			
#1	FO - UFMG	Parafina	Manual
#2	FO - UFMG	Parafina	Manual
#3	FO - UFMG	Parafina	Manual
#4	FO - UFMG	Parafina	Manual
#5	FO - UFMG	Parafina	Manual
#6	FO - UFMG	Parafina	Manual
#7	FO - UFMG	Parafina	Manual
#8	FO - UFMG	Parafina	Manual
#9	FO - UFMG	Parafina	Manual
#10	FO - UFMG	Parafina	Manual
#11	FO - UFMG	Parafina	Manual
#12	FO - UFMG	Parafina	Manual
#13	FO - UFMG	Parafina	Manual
#14	FO - UFMG	Parafina	Manual
#15	FO - UFMG	Parafina	Manual
#16	FO - UFMG	Parafina	Manual
<b>Amostras Sequenciamento</b>			
#1	FM – UFMG	Fresco	Não utilizado na LOH
#2	FM – UFMG	Fresco	Não utilizado na LOH
#3	FM – UFMG	Fresco	Não utilizado na LOH
#4	FM – UFMG	Fresco	Não utilizado na LOH
#5	FM – UFMG	Fresco	Não utilizado na LOH

FO – UFMG – Faculdade de Odontologia da UFMG, FM – UFMG – Faculdade de Medicina da UFMG.

Para a microdissecção a laser, foi preparada uma nova lâmina, com um corte de 6 µm de espessura, em uma membrana especial (MMI membrane slide, Glattbrugg, Suíça) para a utilização no microscópico de dissecção a laser do sistema Olympus IX 81-laser MMI Cell Cut (MMI Glattbrugg, Suíça). Em seguida, as áreas normais e tumorais foram selecionadas e seccionadas a laser, no aumento de 200x e coletadas em microtubos estéreis separados para posterior extração do DNA do tecido.

Para a microdissecção manual, a lâmina corada por hematoxilina e eosina (HE) já com a delimitação das áreas normais e alteradas, foi sobreposta ao bloco de parafina e realizada a delimitação das áreas com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril (nº 15). Em seguida, os blocos foram cortados em micrótomo em 10 cortes de 10 µm e o material foi coletado em microtubos estéreis separados para posterior extração do DNA do tecido de ambas regiões.

#### **4.3 Extração de DNA dos tecidos parafinados**

Para a extração de DNA dos tecidos incluídos em parafina (CCEL, N=17; QA, N=16), foi utilizado o kit de extração de DNA Qiagen, *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*, de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen, Hilden, Germany). O protocolo de extração encontra-se no apêndice 1.

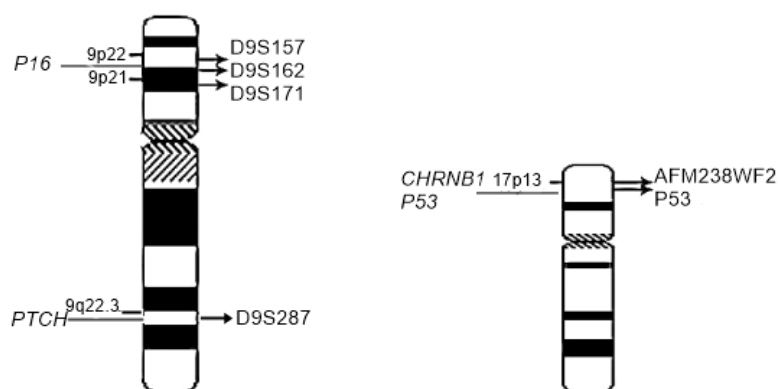
#### **4.4 Extração de DNA dos tecidos frescos**

Para extração do DNA dos espécimes frescos, utilizou-se kit *DNeasy Blood & Tissue kit* (Qiagen, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. O protocolo de extração encontra-se no apêndice 2.

#### 4.5 Avaliação da LOH

A avaliação da LOH foi realizada a partir da amplificação de regiões genômicas específicas, chamadas de regiões de microssatélite. Para tal análise, inicialmente, cada sequência foi amplificada pela Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR) com um par de oligonucleotídeos (iniciadores), sendo o primer *Forward* marcado com os agentes fluorescentes.

Para avaliar LOH, foi selecionado, inicialmente, um painel de oito marcadores para os casos de CCEL e de QA. Os *primers* possuem marcadores fluorescentes e englobam regiões microssatélites próximas a genes supressores de tumor. Os marcadores foram escolhidos baseados em estudos prévios de LOH que demonstraram alta frequência de LOH em CCE intrabucal e carcinoma de células basais de pele. A posição dos marcadores em relação aos cromossomos está demonstrada na figura 05 e as sequências descritas no quadro 1. Os marcadores D3S1293 e D11S1369 (cromossomos 3 e 11, respectivamente) apresentaram problemas de amplificação pela técnica de PCR, tendo poucas amostras amplificadas e por isso, foram excluídos dos resultado.



**Figura 5: Localização dos marcadores microssatélites nos cromossomos 9p, 9q e 17p:** Os marcadores D9S157, D9S162, e D9S171 encontram-se localizados no braço curto do cromossomo 9 (ilustrado à esquerda), enquanto que o marcador D9S287 localiza-se no braço longo do mesmo cromossomo. Os marcadores AFM238WF2 e P53 localizam-se no braço curto do cromossomo 17 (ilustrado à direita).

**Quadro 1: Marcadores microsatélites de LOH utilizados no estudo**

Marcador	Locus	Sequência do Primer	Tipo de repetição	Amplicon
D3S1293	3p24.3	F: ACTCACAGAGCCTTCACA R: CATGGAAATAGAACAGGGT	Di (CA)	116-144 bp
D9S287	9q22-23	F: GCTATGACTTGTTCTGTGACAA R: CACTACATTGTTCAAGGGTCA	Di(CA)	105 pb
D9S157	9p22	F: AGCAAGGCAAGCCACATTTTC R: TGGGGATGCCAGATAACTATATC	Di (CA)	133-149 bp
D9S162	9p22-p13	F: GCAATGACCAGTTAAGGTTTC R: AATTCCCACAACAAATCTCC	Di (CA)	172-196 bp
D9S171	9p22-p21	F:AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT R: ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT	Di (CA)	158-177 bp
D11S1369	11q13.4	F: CCACAGCACTGATACATGGA R: TCAGTCTCAAGTCAAAAGTAATCG	Tetra (GATA)	180 bp
AFM238FW2	17p13.1	F: AACAGCCTGTGCAACATAGT R: AGCTCGAAGCAACAACACTT	Di (CA)	160 bp
TP53	17p13.1	F: TACAGGGATAGGTAGCCCGAG R: GGATTTGGGCTCTTTTGTA	Di (CA)	149 bp

F: *Primer Forward*; R: *Primer Reverse* ; DI: dinucleotídeo; Tetra: tetranucleotídeo; CA e GATA: Bases nitrogenadas repetidas em tandem na região microsatélite; pb: pares de base; PCR: *Polimerase Chain Reaction*.

Todas as reações de PCR foram realizadas em ambas as amostras de DNA do tecido alterado e do tecido normal adjacente. Para cada amostra foi adicionado mix contendo 0,3  $\mu$ M de cada primer, 100 ng de DNA extraído, 0,25  $\mu$ M de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 1,5  $\mu$ l (1X) de tampão de PCR e 1 unidade de enzima taq (AmpliTaq Gold polymerase- Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), totalizando um volume final de 15 $\mu$ l. Após o PCR, para a verificação de amplificação das regiões estudadas, foi realizada a eletroforese, em gel de poliacrilamida 6,5%, corado pela prata.



Em seguida, os produtos foram submetidos à eletroforese capilar utilizando o sequenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Um  $\mu\text{l}$  do produto de PCR foi diluído em água ultrapura deionizada, numa proporção que variou de 1:0 a 1:80 (produto de PCR/água milliQ). Essa diluição variou baseando-se na intensidade da banda de amplificação no gel de poliacrilamida. Em seguida, 1  $\mu\text{l}$  da diluição foi homogeneizado com 12  $\mu\text{l}$  de formamida e 0,5  $\mu\text{l}$  de GeneScan (500) TAMRA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Por fim, as amostras foram desnaturadas por 5 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$  e posteriormente analisadas por eletroforese capilar. Para a análise das corridas, foi utilizado o software GeneMapper® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A LOH foi calculada baseando-se na razão entre o valor da altura do alelo 1 (A1) dividida pela altura do alelo 2 (A2) das amostras de tecido normal e tumoral (VAN HOUTEN *et al.*, 2000) de acordo com a fórmula:

$$\frac{A1 \div A2 \text{ (normal)}}{A1 \div A2 \text{ (tumor)}}$$

Quando havia a presença dos dois alelos de tamanhos diferentes na amostra normal, os dois alelos na amostra tumoral, e a proporção entre eles estava entre 0,5 e 2, foi determinado que houve a retenção do alelo. Os casos em que havia a presença de dois alelos na amostra normal, dois alelos na amostra tumoral, mas a proporção estava abaixo de 0,5 ou acima de 2,0, foram considerados como LOH (VAN HOUTEN *et al.*, 2000). Os casos em que havia a presença de dois alelos na amostra normal e somente um alelo na amostra tumoral foram considerados como LOH. Os casos cujo dois alelos da amostra normal tinham o mesmo tamanho foram considerados homozigotos e, por fim, os casos em que não houve amplificação na amostra normal ou na amostra tumoral foram

considerados inconclusivos. Antes de serem considerados inconclusivos, eram feitas no mínimo três tentativas de amplificação das amostras seguindo o protocolo padronizado para cada marcador. Quando necessário, foram feitas as correções de *Stutter*. O *stutter* é a presença de picos menores que surgem antes do pico principal (alelo) devido a problemas de amplificação da amostra (VAN HOUTEN *et al.*, 2000). Os picos eram determinados pelo *Software* do sequenciador genético, conferidos manualmente, e todos os resultados foram conferidos manualmente por dois examinadores.

A frequência de perda alélica (*fraction of allelic loss* - FAL) foi calculada para cada amostra e para cada marcador através do número de loci que apresentaram LOH dividido pelo número de loci que foram informativos (FOWLER *et al.*, 2006).

#### **4.6 Sequenciamento direto dos éxons do *TP53***

O sequenciamento genético é uma técnica utilizada em biologia molecular que permite a verificação da sequência genômica de qualquer amostra de DNA. O sequenciamento direto utiliza corantes fluorescentes para marcar os produtos de extensão e requer amostra de DNA, primer de sequenciamento, uma polimerase termo estável, desoxinucleotídeos (dNTPs), didesoxinucleotídeos (ddNTPs) e tampão combinados em uma reação semelhante à técnica de PCR. Para a realização do sequenciamento dos éxons do *TP53* nos 5 casos congelados de CCEL, foram utilizados 7 pares de primers que flanqueavam os éxons de 2-11 (o 1 foi excluído por não ser codificante de proteínas), sendo a sequência dos oligonucleotídeos, conforme a descrita pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*, da OMS) representados no quadro 2 (GOMES *et al.*, 2012).

As amostras com DNA extraído foram primeiramente submetidas à reação de PCR para amplificação de cada um dos éxons do gene. As condições de ciclagem estão descritas de acordo o protocolo da IARC (apêndice 4). Após a amplificação, os produtos foram purificados, utilizando-se o kit *illustra<sup>TM</sup> GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), seguindo as orientações do fabricante.

O produto do PCR foi submetido à eletroforese capilar na plataforma ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise visual das sequências foi realizada manualmente por meio do programa *Sequence Scanner 2.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), e comparada com a sequência genômica base NC\_000017.10 da IARC.

**Quadro 2: Marcadores genéticos utilizados no estudo da mutação dos éxons do TP53**

Código IARC	Primer	Direção	Região amp	Tamanho Prod
P-559	tctcatgctggatccccact	F	Exons 2-3	344 bp
P-E3Ri	agtcaaggaccagggtcctc	R		
P-329	tgctcttttcacccatctac	F	Exon 4	353 bp
P-330	atacggccaggcattgaagt	R		
P-236	tggtcacttggtgccctgact	F	Exons 5-6	467 bp
P-240	ttaacccctcctcccagaga	R		
P-333	cttgccacaggctctcccaa	F	Exon 7	237 bp
P-313	aggggtcagaggcaagcaga	R		
P-314	ttgggagtagatggagcct	F	Exons 8-9	445 bp
P-315	agtgttagactggaaacttt	R		
P-E10Li	caattgtaactgaaccatc	F	Exon 10	260 bp
P-562	ggatgagaatggaatcctat	R		
P-E11Le	agaccctctcactcatgtga	F	Exon 11	245 bp
P-E11Re	tgacgcacacctattgcaag	R		

Legenda: F – *foward*, R – *reverse*, bp – pares de base

Após a análise visual e comparação da sequência, todas as alterações encontradas foram revistas por dois avaliadores (C.C. Gomes e G.T.B. Correa). Em seguida, foram

nomeadas e foi realizada uma busca nos principais bancos de dados de mutações genéticas (IARC - <http://p53.iarc.fr/>, Catalogo of somatic mutations in cancer –COSMIC <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>, e 1000GENOMES <http://www.1000genomes.org/data>) para verificar se as alterações já haviam sido descritas. Por fim, foi avaliado se a alteração encontrada poderia afetar a estabilidade e funcionalidade da proteína. Para isso, foram utilizadas duas ferramentas *online*, a *PolyPhen-2* ([genetics.bwh.harvard.edu/pph2/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)) que dá escores para os danos da mutação variando de zero a um, (sendo o escore um o pior resultado) e pela SIFT ([sift.jcvi.org](http://sift.jcvi.org) - os escores variam de zero a um, sendo o zero o pior resultado).

#### **4.7 Reações de imunohistoquímica**

Para avaliar a expressão das proteínas p53 e Ki-67, foi realizada técnica de imunohistoquímica em todas as lesões de QA e CCEL parafinados. Os fragmentos histológicos foram submetidos a cortes de 4µm em micrótomo manual, em seguida, aderidos às lâminas de vidro polarizadas (StarFrost® Green, Sakura, Japão), para melhor fixação do tecido.

A imunohistoquímica foi realizada manualmente seguindo os procedimentos padrão, utilizando os anticorpos p53 (clone DO7, Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca, concentração 1:50) e Ki-67 (clone MIB-1 Dako Cytomation, Glostrup, Dinamarca, concentração 1:100) (apêndice 3). Para cada anticorpo, controles negativos (omissão do anticorpo primário) e positivos (CCE intrabucal, com imunorreatividade conhecida) foram incluídos em cada experimento.

Foram consideradas positivas as células que exibiram um perfil de imunolocalização compatível com aquela observada no tecido utilizado como controle positivo, independentemente da intensidade da coloração obtida ao final da reação.

Ambos anticorpos são de marcação nuclear (GERDES *et al.*, 1983; WARNAKULASURIYA; JOHNSON, 1994).

#### **4.8 Avaliação da imunohistoquímica**

Os procedimentos de avaliação foram realizados inicialmente por um avaliador, e conferidos posteriormente por um segundo avaliador calibrado com o primeiro, em momentos diferentes, com microscópio óptico (ZEISS), no aumento de 400X. Foram feitas contagens dos núcleos celulares marcados das células epiteliais. Os campos foram obtidos com microscópio de luz com aumento de 400x, sob foco fixo, contendo uma ocular com retículo integrador de 100 pontos. Foram selecionados 8 campos microscópicos para contagem dos marcadores investigados. A contagem se iniciou na região de maior marcação do anticorpo. A contagem desses imunomarcadores considerou as células epiteliais alteradas localizadas em todo o parênquima da lesão. Após contagem das amostras, foi calculada a porcentagem de células marcadas em relação ao total das contadas no campo. Então foi calculada a mediana da porcentagem para cada marcador. A categorização da marcação imunohistoquímica foi feita de duas formas: de acordo com a porcentagem de células positivas (cutt-off) em 10%; e de acordo a mediana da porcentagem de contagem. E as amostras categorizadas como de baixa e alta expressão tecidual para os biomarcadores investigados.

#### **4.9 Análise estatística**

Para a verificação da associação das variáveis categóricas foram realizados os testes de Qui-quadrado e o teste exato de Fisher (quando aplicável). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Foi realizada também nas análises a correção de Bonferroni. A correção de Bonferroni é um procedimento estatístico utilizado quando se

realiza comparações de múltiplas proporções para diferentes grupos. A realização de múltiplas comparações aumenta as chances de ocorrer erros do tipo I, ou seja, associações não significantes dentro do intervalo de confiança previamente estipulado. A correção de Bonferroni altera o nível de significância (p) a fim de evitar erros derivados da múltipla comparação. Para as análises, utilizou-se o software estatístico SPSS versão 22.0 (SPSS Inc; Chicago, IL, USA).

Para a realização dos testes, as variáveis foram agrupadas. Para variável idade, foram agrupados em abaixo e acima de 45 anos de idade (DE PAULA *et al.*, 2009; SCULLY; BAGAN, 2009). Para a variável cor, indivíduos leucodermas foram categorizados como pessoas brancas. Os indivíduos feodermas e melanodermas foram categorizados como pessoas não brancas. Na variável, tamanho da lesão, na QA, foi calculada a mediana do tamanho (10mm) e depois, categorizada em acima e abaixo da mediana da lesão (DE PAULA *et al.*, 2009; SCULLY; BAGAN, 2009). Para os casos de CCEL, as lesões foram agrupadas a partir do estágio TNM. Estádios I e II foram considerados iniciais; III e IV foram considerados como estádios tardios. Sobre os hábitos, tabagista e etilista, foi considerado somente o consumo ou não consumo, já que, por ausência de dados, não foi possível avaliar a quantidade ou o tempo de uso. Foi considerado tabagista ou etilista aquele que fazia uso dessas substâncias há pelo menos um ano e não as utilizava de forma casual.

Todos os dados foram coletados a partir de prontuários clínicos e quando possível, através da entrevista aos pacientes. Grande parte dos dados dos prontuários estava preenchida de forma incompleta, e características importantes como tempo de exposição à luz solar ou tipo de trabalho (como ou sem exposição solar) não eram abordados, o que é considerado uma limitação para este estudo.

## 5 Resultados

Serão apresentados inicialmente os resultados obtidos nos estudos da imunohistoquímica e da LOH para os 16 casos de QA e 17 CCEL, em separado. Em seguida, serão descritos os resultados encontrados nas análises da relação entre essas duas lesões nos estudos de imunohistoquímica e LOH. E por fim, serão apresentados os resultados dos sequenciamentos dos éxons do *TP53* nos 5 casos congelados de CCEL e dos casos amplificados de parafina de QA e CCEL.

### 5.1 Queilite Actínica

Entre os 16 casos de QA incluídos no estudo, a maior parte ocorreu em homens (14/16), a média de idade foi de 55 anos de idade (idade mínima 27 anos, máxima, 84, desvio padrão, 15), sendo 11 pacientes com a cor da pele branca e 5 pacientes não brancos. Considerando os 9 casos em que se pôde avaliar os hábitos tabagista e etilista, 4 pacientes declararam-se como tabagistas e 3 como etilistas, sendo que ambos os hábitos concomitantemente foram declarados em 2/9 casos. Todas as lesões acometiam o lábio inferior, podendo ou não se estender para a comissura labial. Com relação à dimensão clínica da lesão, a média foi de 10 mm, mediana de 9 mm variando de 3 a 30 mm. Os dados se encontram descritos na tabela 02.

**Tabela 2: Dados clínicos dos pacientes de QA do estudo (N= 16)**

Caso	Gênero	Idade	Cor da pele	Hábito Tabagista	Hábito Etilista	Dimensão clínica
#1	M	44	B	N	N	5 mm
#2	M	40	B	-	-	9 mm
#3	M	56	B	N	S	15 mm
#4	M	56	NB	S	S	10 mm
#5	M	68	NB	S	S	5 mm
#6	M	54	B	-	-	5 mm
#7	M	38	B	N	N	7 mm
#8	M	80	NB	-	-	20 mm
#9	M	46	NB	-	-	9 mm
#10	M	-	B	-	-	30 mm
#11	M	63	B	N	N	9 mm
#12	F	54	B	S	N	20 mm
#13	F	27	B	N	N	3 mm
#14	M	56	NB	-	-	9 mm
#15	M	84	B	-	-	9 mm
#16	M	62	B	S	N	10 mm

**Legenda:** M – Masculino, F – Feminino, B – Branco, NB – Não Branco – S – Sim, N – Não, mm – milímetros.

### 5.1.2 Análise da Imunohistoquímica

Realizou-se a técnica de imunohistoquímica para as proteínas p53 e Ki-67 nas 16 amostras de QA. Os resultados mostraram frequente positividade das células para a proteína p53 (tabela 3), sendo que 12/16 (75%) amostras mostraram positividade superior a 10% das células para o marcador. Já para a proteína Ki-67, cinco amostras (31,3%) tiveram positividade acima de 10% das células epiteliais. Somente uma amostra dos 16 casos não apresentou reatividade para os marcadores. Entretanto, o controle positivo da reação funcionou em ambos os marcadores.



**Tabela 3: Positividade das células imunomarcadas para p53 e Ki-67 nos casos de QA do estudo (N=16)**

Caso	% p53	%Ki67
#1	6,0	35,0
#2	46,0	1,0
#3	50,0	25,0
#4	40,0	1,0
#5	78,0	5,0
#6	73,0	5,0
#7	5,0	5,0
#8	57,0	2,0
#9	48,0	22,0
#10	77,0	68,0
#11	5,0	5,0
#12	74,0	1,0
#13	33,0	5,0
#14	77,0	75,0
#15	20,0	2,0
#16	NR	NR

NR – Não reativo

### 5.1.3 Dados Moleculares da LOH nos casos de Queilite Actínica

A tabela 4 apresenta o consolidado dos resultados encontrados para a LOH nos casos de QA. A LOH esteve presente em 9 dos 16 casos estudados (56,25%). Os casos #1, #9, #10 e #13 apresentaram perda em 2 dos 6 marcadores estudados, sendo que os casos 1 e 9 foram os que apresentaram maior frequência de perda alélica (FOWLER *et al.*, 2006). A média da FAL das amostras foi de 23,65%, mediana de 22,5%, variando de 0% a 66%.

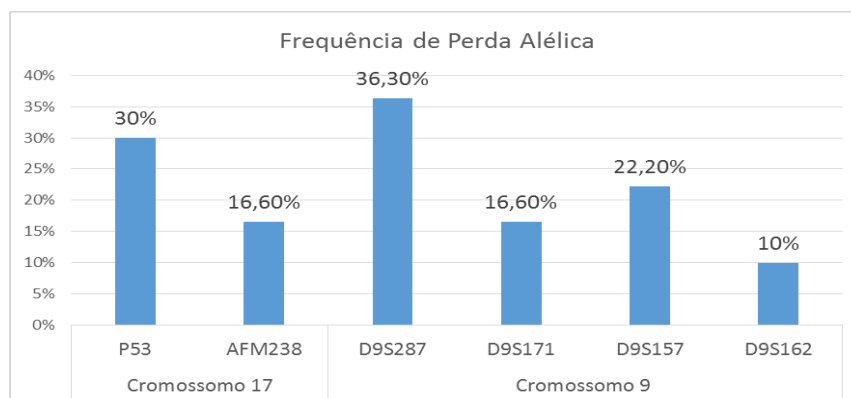
**Tabela 4: Dados dos marcadores utilizados para analisar a LOH nas amostras de QA**

Lesão	Caso	P53	AFM23 8WF2	D9S287	D9S171	D9S157	D9S162
QA	#1	●	△	●	□	□	○
QA	#2	○	○	○	□	●	△
QA	#3	○	○	□	△	□	○
QA	#4	□	○	●	□	△	□
QA	#5	□	○	△	□	○	○
QA	#6	□	○	○	□	●	○
QA	#7	○	□	○	○	○	○
QA	#8	△	□	○	□	○	△
QA	#9	●	□	●	□	△	○
QA	#10	△	○	●	●	○	□
QA	#11	△	○	○	○	△	●
QA	#12	○	○	○	□	□	□
QA	#13	●	●	□	○	□	○
QA	#14	○	●	□	○	○	○
QA	#15	○	○	○	○	○	△
QA	#16	○	○	□	□	○	○

(○) Retenção Alélica; (□) Homozigoto (●) LOH ; (△) Inconclusivo

O gráfico 1 mostra os dados da frequência de perda alélica por marcador, separados pelas regiões cromossômicas. Os resultados mostraram que a LOH esteve presente em todas as regiões estudadas, sendo o marcador D9S287 o que apresentou maior percentual (36,3%) de casos com LOH entre os marcadores. Os outros dados foram *TP53* (30%), AFM238WF2 (16,6%) (marcadores do cromossomo 17); D9S171 (16,6%), D9S157 (22,2%) e D9S162 (10%) (marcadores do cromossomo 9).

**Gráfico 1: Frequência de perda alélica dos marcadores nos casos de QA**



Para verificar se a LOH na QA teria alguma associação com os fatores clínicopatológicos do paciente, foi realizado o teste estatístico do qui-quadrado com correção exata de Fisher. Para a realização dos testes, a LOH foi organizada de três formas diferentes.

Inicialmente, analisou-se, para cada paciente, entre os casos informativos, se havia ou não perda em pelo ao menos um dos seis marcadores estudados. Em nove dos 16 casos, houve perda de pelo menos um marcador. Após isso, a variável foi categorizada em LOH e não LOH.

Para a segunda análise, novamente os casos foram categorizados em LOH e não LOH, agora somente para o cromossomo 9. Sete casos (43,8%) apresentaram LOH em algum marcador do cromossomo 9.

Para a terceira análise, foi realizada a mesma análise para o cromossomo 17. Quatro casos apresentaram LOH para o cromossomo 17. O consolidado dos resultados é apresentado na Tabela 05.

**Tabela 5: Resultados da LOH comparados com características clínicas.**

Características	LOH total		p	LOH cromossomo 9		P	LOH cromossomo 17		p
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>Idade</b>									
Abaixo de 45 anos	2 (50,0%)	2 (50,0%)	0,66	2 (50,0%)	2 (50,0%)	0,53	3(75%)	1(25%)	0,72
Acima de 45 anos	5 (45,5%)	6 (54,5%)		7 (63,6%)	4 (36,4%)		8(72,7%)	3(27,3%)	
<b>Cor</b>									
Branco	6 (54,5%)	5 (45,5%)	0,23	8 (72,7%)	3 (27,3%)	0,07	8(72,7%)	3(27,3%)	0,63
Não Branco	1 (20%)	4 (80%)		1 (20%)	4 (80%)		4(80%)	1(20%)	
<b>Tamanho</b>									
Lesões até 10 mm	4 (40%)	6 (60%)	0,54	5 (50%)	5 (50%)	0,45	8(80%)	2(20%)	0,48
Lesões acima de 10mm	3 (50%)	3 (50%)		4 (66,7%)	2 (33,3%)		4(66,7%)	2(33,3%)	
<b>Hábito Tabagista</b>									
Ausente	2 (40%)	3 (60%)	0,35	4 (80%)	1 (20%)	0,72	2(40%)	3(60%)	0,11
Presente	3 (75%)	1 (25%)		3 (75%)	1 (25%)		4(100%)	0(0%)	
<b>Hábito Etilista</b>									
Ausente	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0,40	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,58	4(66,7%)	2(33,3%)	0,76
Presente	1 (33,3%)	2 (66,7%)		5 (83,3%)	1 (16,7%)		2(66,7%)	1(33,3%)	
<b>Positividade para p53 (1)</b>									
Até 10% das células	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,65	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,44	2(66,7%)	1(33,3%)	0,63
Acima de 10% das células	5 (41,7%)	7 (58,3%)		7 (58,3%)	5 (41,7%)		9(75%)	3(25%)	
<b>Positividade para p53 (2)</b>									
Até 72% marcação	4 (40%)	6 (60%)	0,70	5 (50%)	5 (50%)	0,57	7(70%)	3(30%)	0,59
Acima de 72% marcação	2 (40%)	3 (60%)		3 (60%)	2 (40%)		4(80%)	1(20%)	
<b>Positividade para o Ki-67 (1)</b>									
Até 10% das células	5 (50%)	5 (50%)	0,29	6 (60%)	4 (40%)	0,42	9(90%)	1(10%)	0,77
Acima de 10% das células	1 (20%)	4 (80%)		2 (40%)	3 (60%)		2(40%)	3(60%)	
<b>Positividade para o Ki-67 (2)</b>									
Até 5% das células	5 (50%)	5 (50%)	0,29	6 (60%)	4 (40%)	0,42	9(90%)	1(10%)	0,77
Acima de 5% das células	1 (20%)	4 (80%)		2 (40%)	3 (60%)		2(40%)	3(60%)	

LOH total: LOH em pelo ao menos um marcador

LOH cromossomo 9: LOH em pelo ao menos um marcador do cromossomo 9

LOH cromossomo 17: LOH em pelo ao menos um marcador do cromossomo 17

- (1) Categorização da expressão imunohistoquímica de acordo a porcentagem de células positivas. (*cutt-off*) em 10%
- (2) Categorização da expressão imunohistoquímica de acordo a mediana da porcentagem contagem.

Os resultados da tabela 5 demonstraram não haver associação estatisticamente significativa entre nenhuma das variáveis clínico patológicas estudadas e as regiões cromossômicas estudadas. Por fim, foi realizado o teste do qui-quadrado para cada marcador *versus* as variáveis clinicopatológicas. Não foi encontrado nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os dados (dados não mostrados).

## **5.2 Carcinoma de células escamosas de lábio**

Para a avaliação da LOH em CCEL foram analisados 17 casos, sendo 16 homens e uma mulher, com média de idade de 65 anos (idade mínima 30, máxima 92, desvio padrão de 17,9).

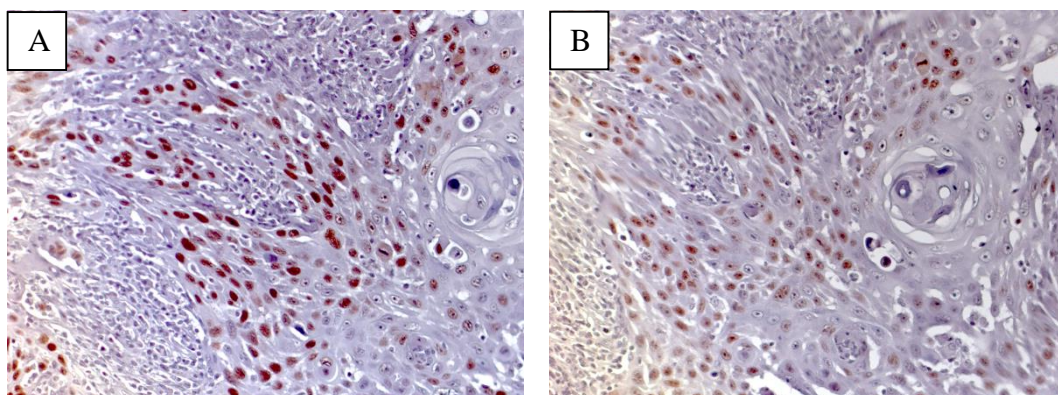
Foram seis pacientes brancos e 11 pacientes não brancos. Com relação ao estadiamento clínico da lesão (TNM), 64,7% (n=11) dos indivíduos estavam nos estágios iniciais da doença (I e II), 29,4% (n=5) já apresentavam metástase regional (n+), com linfonodos palpáveis na região cervical, ao exame clínico inicial.

Quatorze (82,4%) dos pacientes eram tabagistas, porém somente 4 (23,5%) indivíduos eram etilistas.

### **5.2.2 Análise da Imunohistoquímica**

Realizou-se imunohistoquímica para os marcadores p53 e Ki-67 nas amostras de CCEL (figura 8). Foram excluídos quatro e cinco casos das proteínas p53 e Ki-67, respectivamente, em virtude da não reatividade do tecido ou quantidade insuficiente de material para análise imunohistoquímica. Todos os casos de CCEL, para a p53, apresentaram positividade superior a 10 % das células. Já para o Ki-67, 8 casos (66,7%) apresentaram positividade acima de 10% das células. A seguir, na tabela 6, é possível

observar o consolidado dos resultados demográficos, clínicopatológicos e de imunohistoquímica dos pacientes estudados.



**Figura 6: Expressão imunohistoquímica das proteínas p53 e Ki-67 em CCEL:** Na imagem A é possível observar a imunoexpressão da proteína p53. Já na imagem B está a expressão da proteína Ki-67.

**Tabela 6: Dados clínicos e imunohistoquímicos e demográficos dos casos de CCEL**

Paciente	Gênero	Idade	Cor da pele	Hábito Tabagista	Hábito Etilista	TNM	%P53	% Ki-67
#1	M	89	B	S	N	T3N2M0	97,0	67,0
#2	M	44	B	N	N	T1N0M0	NR	NR
#3	M	92	NB	S	N	T4N1M0	NR	NR
#4	M	30	NB	S	N	T2N0M0	74,0	5,0
#5	M	77	NB	S	N	T1N0M0	72,0	75,0
#6	M	61	NB	S	N	T1N0M0	68,2	5,0
#7	M	56	NB	N	S	T2N0M0	76,0	1,0
#8	M	58	NB	S	S	T3N0M0	48,0	1,0
#9	M	83	B	S	S	T1N0M0	NR	NR
#10	M	78	B	S	N	T1N0M0	77,0	75,0
#11	M	60	NB	S	N	T3N2MX	96,0	96,0
#12	M	71	NB	S	S	T3N1M0	86,0	73,0
#13	F	52	NB	S	N	T2N0M0	64,0	49,0
#14	M	59	NB	S	N	T4N2M0	89,0	80,0
#15	M	88	B	S	N	T1N0M0	80,0	NR
#16	M	58	NB	S	N	T2N0M0	NR	NR
#17	M	41	B	N	N	T2N0M0	78,0	83,0

M – Masculino, F – Feminino, B – Branco, NB – Não Branco – S – Sim, N – Não NR – Não Reativo, - Dados ausentes.

### 5.2.3 Dados Moleculares da LOH nos casos de CCEL

A tabela 7 apresenta o consolidado dos resultados encontrados para a LOH nos casos de CCEL. A LOH esteve presente em, no mínimo, um marcador de 15 dos 17 casos estudados (88,2%). Para o cromossomo 9, 64,7% (n=11) casos apresentavam LOH. Para o cromossomo 17p, 11 casos apresentaram LOH para essa região cromossômica.

O caso #14, apesar de ter apresentado uma FAL de 50%, demonstrou maior quantidade de marcadores com LOH, estando ela presente em três dos seis marcadores. Os casos #3, #4, #8 apresentaram perda em 2 dos 6 marcadores estudados. A média da FAL das amostras foi de 36%, mediana de 33%, variando de 0% a 100%.

**Tabela 7: Dados da LOH das amostras de CCEL.**

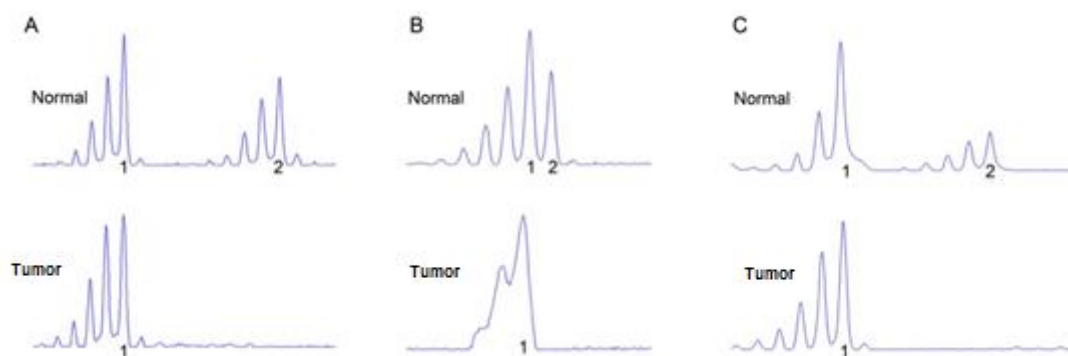
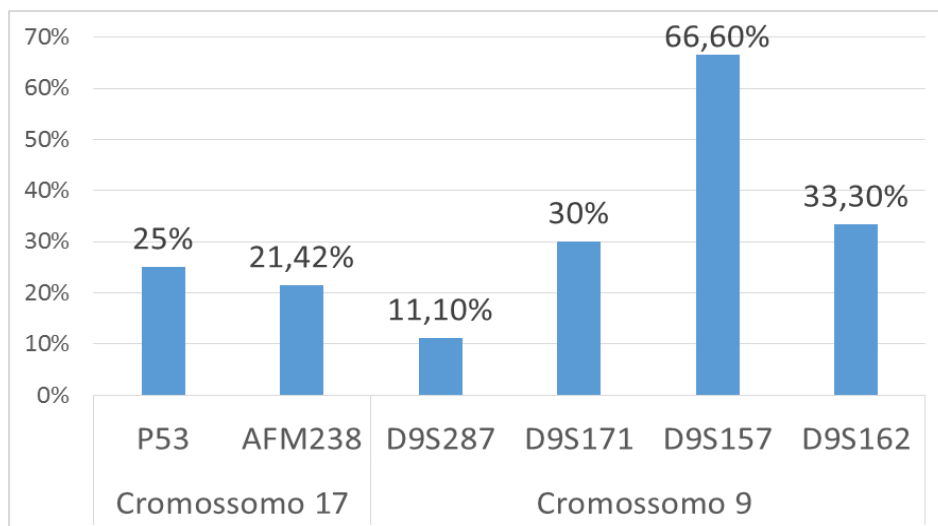
Lesão	Caso	P53	AFM23 8WF2	D9S287	D9S171	D9S157	D9S162
CCEL	#1	△	●	○	○	○	○
CCEL	#2	○	●	□	○	△	□
CCEL	#3	□	○	□	○	●	●
CCEL	#4	○	○	○	●	●	□
CCEL	#5	□	□	●	○	□	○
CCEL	#6	○	○	○	□	□	○
CCEL	#7	●	□	□	□	●	○
CCEL	#8	○	○	□	○	●	●
CCEL	#9	□	□	○	○	●	○
CCEL	#10	□	○	○	●	□	□
CCEL	#11	○	○	○	□	●	○
CCEL	#12	△	○	□	△	●	□
CCEL	#13	●	○	○	□	○	△
CCEL	#14	○	○	○	●	●	●
CCEL	#15	□	●	□	□	△	□
CCEL	#16	△	○	△	●	○	□
CCEL	#17	□	○	□	△	○	□

(○) Heterozigoto; (□) Homozigoto (●) LOH ; (△ ) Análise inconclusiva

Quando observada a FAL para cada marcador, verificou-se que a maior porcentagem de LOH ocorreu no marcador D9S157, estando presente em 66% dos casos

válidos. Os dados da FAL estão representados no gráfico 03. Já a figura 6 demonstra como foram realizadas as avaliações de LOH a partir dos eletroferogramas obtidos.

**Gráfico 2: Frequência de perda alélica dos marcadores nos casos de CCEL**



**Figura 7: Exemplos representativos de LOH em CCEL:** DNA de amostras de tumor mostrou perda do alelo longo em comparação com o DNA de tecido normal. Marcador, P53 (A) e AFM238WF2 (B e C); alelo curto (1) e o alelo longo (2). Capturas de telas geradas dos eletroferogramas a partir do software GeneMapper® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Para verificar se a LOH no CCEL apresentava alguma associação com fatores clinicopatológicos do indivíduo, realizou-se o teste estatístico do qui-quadrado e exato de Fisher. Foram feitos os testes comparando a LOH em todos os marcadores; comparando-



se LOH no cromossomo 9 e 17, com os fatores clinicopatológicos dos pacientes portadores de CCEL. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os fatores clinico-patológicos e a LOH (apêndice 5).

### 5.3 Comparações dos resultados de QA e CCEL

Para a comparação dos resultados da QA e CCEL, foi realizado o teste estatístico do qui-quadrado ( $p < 0.05$ ) para as variáveis clinicopatológicas e de LOH. Os resultados são mostrados nas tabelas 8 e 9.

A tabela 8 apresenta os resultados encontrados para essa comparação. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para nenhuma das variáveis avaliadas. A tabela também apresenta os resultados do percentual de marcação imunohistoquímica de ambas as lesões, não havendo novamente diferenças estatisticamente significantes.

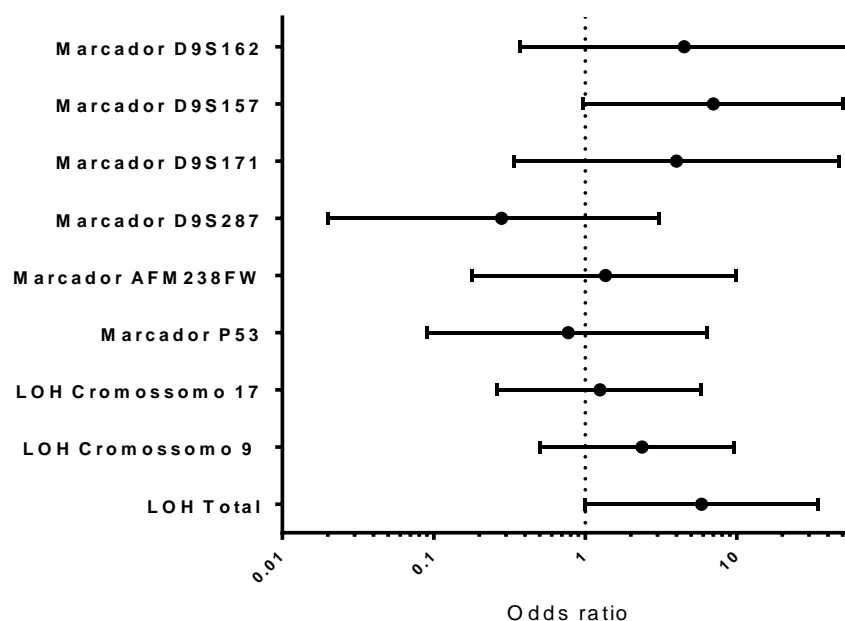
**Tabela 8: Teste do qui-quadrado para as características clinicopatológicas e imunohistoquímica dos pacientes de CCEL e QA.**

Características	LOH total		P
	Queilite Actínica, N (%)	CCEL, N (%)	
<b>Hábito Tabagista</b>			
Ausente	5 (55,6%)	3 (17,3%)	0.06
Presente	4 (44,4%)	14 (82,4%)	
<b>Hábito Etilista</b>			
Ausente	6 (66,7%)	13 (76,5%)	0.40
Presente	3 (33,3%)	4 (23,5%)	
<b>Positividade da P53</b>			
Até 10% das células	3 (20%)	0(0%)	0.13
Acima de 10% das células	12 (80%)	13 (100%)	
<b>Positividade do Ki67</b>			
Até 10% das células	10 (66,7%)	4 (33,3%)	0.09
Acima de 10% das células	5 (33,3%)	8 (66,7%)	

LOH total: LOH em pelo menos um marcador

O gráfico 3 apresenta os resultados referentes a LOH total, dos cromossomos 9 e 17 e de todos os marcadores de forma isolada. Realizou-se o teste do qui-quadrado e em seguida, feita a correção de Bonferroni. A LOH apresentou-se como um evento mais presente nas lesões neoplásicas (88% - CCEL) quando comparada com as lesões cancerizáveis (56,3% - QA), essa diferença porém, quando aplicada a correção, não é estatisticamente significativa (valor de p da diferença é igual a 0,04, porém o nível de significância do teste vai para 0,001 quando aplicada a correção). Observou-se também uma diferença para o marcador D9S157 ( $p < 0.05$ ), sendo essa perda numericamente mais presente novamente nos casos de CCEL. Mais uma vez, quando aplicada a correção, esse valor não é estatisticamente significativo ( $p = 0,04$ ). Assim, os resultados mostraram que a perda nessa região (9p21) é mais frequente nos casos de carcinoma (66,7%), quando comparados com os casos de QA (22,2%).

**Gráfico 3: Forest plot da LOH do dos marcadores dos cromossomos 9 e 17 comparados entre as lesões de QA e CCEL.**



LOH total: LOH em pelo ao menos um marcador, LOH cromossomo 9: LOH em pelo ao menos um marcador do cromossomo 9, LOH cromossomo 17: LOH em pelo ao menos um marcador do cromossomo 17, Valor de significância do teste = (0,001), parâmetro de referência do teste – QA.

Para comparar se existiam diferenças entre a FAL das lesões, foi realizado o teste não paramétrico *Mann Whitney*. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre as lesões (mediana da FAL para QA = 22,5%; mediana da FAL para CCEL = 33%,  $p = 0,16$ ).

## 5.4 Resultados do sequenciamento dos Éxons do P53

### 5.4.1 Amostras congeladas

Foram utilizadas 5 amostras congeladas de CCEL para a realização do sequenciamento gênico dos éxons 2 ao 11 do gene *TP53*. Foram quatro pacientes do sexo masculino e um do sexo feminino com uma média de idade de 55 anos. Quatro pacientes eram brancos e somente um não branco. Dois pacientes eram tabagistas enquanto três deles eram etilistas casuais.

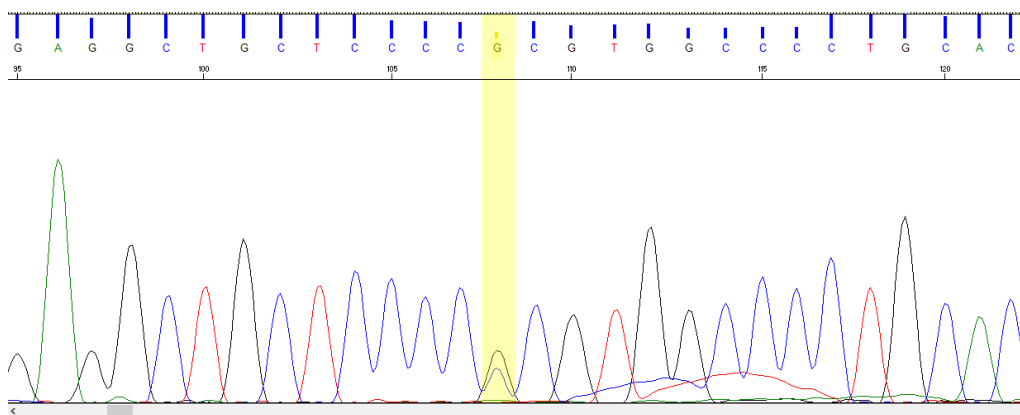
Nas amostras 2 e 3 todos os éxons puderam ser avaliados, entretanto, nas amostras 1, 4 e 5, nem todos os éxons puderam ser sequenciados por erros ocorridos nas reações da PCR (Tabela 9). Para a nomeação das mutações, os números dos nucleotídeos refletem a posição no cDNA com +1 correspondendo ao A do ATG do códon iniciador da tradução na sequência referência da IARC NC\_000017.10.

**Tabela 9: Resumo dos éxons sequenciados em cada amostra fresca de CCEL.**

Exons	Amostra #1	Amostra #2	Amostra #3	Amostra #4	Amostra #5
2 – 3	✓	✓	✓	✓	✓
4	✓	✓	✓	X	✓
5 – 6	✓	✓	✓	✓	✓
7	X	✓	✓	✓	✓
8 – 9	✓	✓	✓	✓	X
10	✓	✓	✓	✓	X
11	✓	✓	✓	✓	✓

✓ , Sequenciamento realizado; X, Sequenciamento não realizado por erro na reação de PCR.

Foram encontradas cinco mutações já descritas em regiões exônicas, sendo duas silenciosas, duas *missenses* e uma *nonsense*. Foi encontrada uma mutação do tipo *missense*, no éxon 4 em 4 amostras, (c.215C>G - rs1042522), heterozigoto, que levou a uma troca de aminoácidos não conservativa (p. P72R) (figura 7). O possível impacto dessa substituição na estabilidade e funcionalidade da proteína foi predita como benigna pelo *PolyPhen-2* ([genetics.bwh.harvard.edu/pph2/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)) (*score* 0.083) e tolerável pelo SIFT ([sift.jcvi.org](http://sift.jcvi.org)) (*score* 0.17). De acordo o banco de dados do NCBI (dbSNP) essa alteração tem um significado clínico incerto.



**Figura 8: Eletrofeograma de uma amostra congelada de CCEL:** Eletrofeograma da amostra #2 congelada de CCEL obtida através do software Sequence Scanner 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) a troca de base C>G está em destaque.

Encontramos uma *missense* heterozigota no éxon 7 da amostra 4 (c.741\_742CC>TT), que era uma substituição dupla de bases que levou a uma troca do aminoácido Arginina pelo Triptofano (p. R248W). O possível impacto dessa substituição na estabilidade e funcionalidade da proteína foi predita como danosa pelos *softwares* *PolyPhen-2* ([genetics.bwh.harvard.edu/pph2/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)) (*score* 1,0) e SIFT ([sift.jcvi.org](http://sift.jcvi.org)) (*score* 0). Uma mutação *nonsense* gerando um códon de parada prematuro tipo *stop-codon* (c.1024C>T) foi encontrada no éxon 10 na amostra 2, sendo sua predição na proteína considerada danosa pelo SIFT (*score* 0.01). As mutações silenciosas encontradas nos

éxons 7 (c.771G>A) e 10 (c.1023C>T) dos tumores #3 e #2, foram heterozigotas e conservaram a transcrição dos aminoácidos leucina (p.L257L) e fenilalanina (p.F341F), respectivamente. Além disso, encontramos três SNPs, sendo dois localizados em regiões intrônicas de todas as amostras dos éxons 2 – 3 (c.74+38C>G) e no íntron das amostras 2 e 3 do éxon 7 (c.782+59T>G). Um outro SNP, de localização na região codificadora, c.215C>G também esteve presente em todas as amostras. Os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 10 abaixo.

**Tabela 10: Mutações e SNPs do gene *TP53* encontrados nos carcinomas de células escamosas de lábio**

<b>Mutação</b>	<i>Localização</i>	<i>Efeito</i>	<i>Predição</i>	<i>Amostra#</i>
c.771G>A	Exon 7	Silenciosa	–	3
c.741_742CC>TT	Exon 7	<i>Missense</i>	Danosa (Polyphen e SIFT)	4
c.1023C>T	Exon 10	Silenciosa	–	2
c.1024C>T	Exon 10	<i>Nonsense</i>	Danosa (SIFT)	2
<b>SNPs</b>				
c.215C>G	Exon 4	<i>Missense</i>	Benigna (Polyphen); Tolerável (SIFT)	1, 2, 3, 5
c.74+38C>T	Exon 2 – 3	Intrônico	–	1,2,3,4,5
c.782+59T>G	Exon 7	Intrônico	–	2, 3

#### 5.4.2 Amostras em parafina

Inicialmente, foram feitas tentativas para que todas as amostras de parafina que foram incluídas no estudo de LOH, pudessem ser sequenciadas para os éxons 5-6, 7 e 8-9 (éxons com maior concentração de mutação). Entretanto, por quantidade insuficiente de DNA, ou por erros nas reações de amplificação dos éxons, nem todas as amostras puderam ser avaliadas para os cinco éxons acima descritos. Os resultados encontrados serão descritos a seguir para cada um dos éxons avaliados.

- **Éxon 5 – 6**

Foram 9 amostras analisadas, sendo que seis eram de CCEL e três eram de QA. Não foram encontradas alterações nas regiões exômicas ou intrônicas nos éxons 5-6 dessas amostras.

- **Éxon 7**

Ao todo, 18 amostras foram avaliadas (8 de CCEL e 10 de QA). A amostra #4 de QA apresentou uma mutação do tipo *missense* (c.673G>A), que levou a uma troca de aminoácidos não conservativa (p.V225I). O possível impacto dessa substituição na estabilidade e funcionalidade da proteína foi predita como benigna pelo *PolyPhen-2* ([genetics.bwh.harvard.edu/pph2/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)) (*score* 0) e danosa pelo SIFT ([sift.jcvi.org](http://sift.jcvi.org)) (*score* 0).

A amostra #13 de QA apresentou uma mutação do tipo *missense* (c.729G>A), levando a uma troca de aminoácidos não conservativa (p.M243I). Essa substituição é possivelmente danosa para a proteína segundo *PolyPhen-2* ([genetics.bwh.harvard.edu/pph2/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)) (*score* 0,99) e SIFT ([sift.jcvi.org](http://sift.jcvi.org)) (*score* 0).

Considerando as regiões intrônicas flanqueadas no éxon 7, todas as 18 amostras apresentaram um polimorfismo intrônico silencioso (c.782+59T>G) já descrito e validado (rs 1642786), além de algumas amostras exibirem mutações intrônicas ainda não descritas nos principais bancos de dados de mutações genéticas existentes (IARC, COSMIC e 1000 GENOMES).

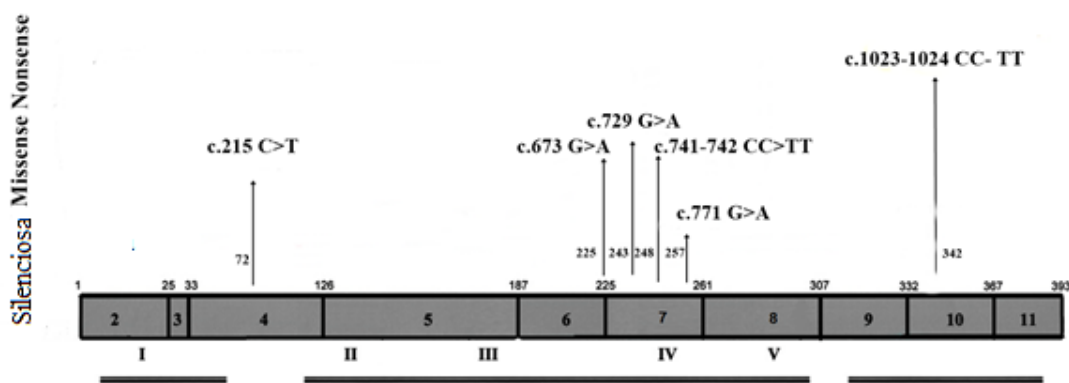
Dentre essas mutações, mutação pontual do tipo transversão (c.782+52C>A), heterozigota foi identificada nas amostras #1, #4, #6, #8, #10 e #13 de CCEL e nas amostras #2, #4, #5, #7, #12, #13 e #15 de QA. Outras mutações pontuais do tipo transversão foram encontradas também nas amostras #5 e #12 de QA na região c.782+54T>A, na amostra #4 de QA (c.782+33C>A) e na amostra #10 na posição

c.782+31G>A. Nenhuma dessas alterações estavam descritas nos principais bancos de dados de mutações genômicas existentes.

- **Éxon 8-9**

Ao todo, 10 amostras foram analisadas (cinco de CCEL e cinco de QA). Não foram encontradas alterações nos íntrons dessas amostras, entretanto, houve uma variação na região codificante do éxon 8 – 9 da amostra #4 de CCEL. Essa amostra apresentou uma mutação do tipo *missense* (c.894G>T), (p.E298D), sendo essa substituição considerada como benigna pelo *PolyPhen-2* ([genetics.bwh.harvard.edu/pph2/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)) (*score* 0) e tolerável pelo SIFT ([sift.jcvi.org](http://sift.jcvi.org)) (*score* 0,21).

A figura 10 demonstra a localização de todas as mutações encontradas nos éxons do *TP53*, do presente estudo.



**Figura 9: Localização das mutações exônicas encontradas no presente estudo.**

Por fim, a tabela 11 mostra um consolidado dos dados encontrados no trabalho com as amostras de parafina.

**Tabela 11: Consolidado dos resultados de LOH e do sequenciamento genético do TP53 das amostras de QA e CCEL**

Seq	Éxon 8-9	QA										CCEL											
Marcadores	Éxon 7																						
	Éxon 5-6																						
	P53																						
	AFM238WF2																						
	D9S287																						
IHQ	D9S171																						
	D9S157																						
	D9S162																						
	ki-67																						
Clínico	p53																						
	*Tamanho																						
	Idade																						
Gênero																							
<b>Casos</b>		<b>QA</b>										<b>CCEL</b>											

Cor	Características	Cor	Características
Amarelo	Feminino	Verde claro	Ki-67 – Até 5%
Verde escuro	Até 45 anos	Verde escuro	Ki-67 – Acima de 5%
Ciano	Acima de 45 anos	Vermelho	LOH
Amarelo claro	Até 10 mm / T1 e TII	Cinza claro	Heterozigoto
Púrpura	Acima de 10mm / TIII e TIV	Cinza escuro	Homozigoto
Verde claro	p53 – Até 10%	Verde claro	Sequência Normal
Verde escuro	P53 – Acima de 10%	Vermelho	Alteração Intrônica
		Vermelho	Alteração Intrônica e Exômica

O tamanho se refere, nos casos de QA, às lesões em mm. Nos casos de CCEL estão relacionados com o T (tamanho tumoral) do estadiamento TNM. Os quadrados em branco são dados perdidos.



## 6 Discussão

A presença de LOH nos cromossomos 9 e 17 tem sido amplamente investigada em vários cânceres humanos e lesões cancerizáveis, incluindo o CCE intrabucal e leucoplasia bucal, bem como carcinomas de células escamosas da pele (GOMES; FONSECA-SILVA; GOMEZ, 2013; GRAVELAND *et al.*, 2011; MAHALE; SARANATH, 2000; MURALI *et al.*, 2011). A LOH tem sido uma ferramenta relevante para a caracterização genômica durante a progressão tumoral em vários tipos de câncer, incluindo os cânceres de pele (CCE, carcinoma basocelular – CBC e o melanoma) (CABRAL *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2004). Não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliassem a LOH nas regiões 9p, 9q e 17p de QA e de CCEL. Portanto, para comparação durante a discussão, serão utilizados resultados encontrados na literatura de CCE e CBC de pele, ceratose actínica de pele e CCE intrabucal.

Em carcinomas escamosas de cabeça e pescoço, 73% dos pacientes com constituição alélica heterozigotos demonstram LOH na região 9p (NG *et al.*, 2000). Ishwad *et al* (1996), em uma série maior de 65 casos de CCE intrabucal, observa-se LOH em 48% dos tecidos tumorais em região cromossômica 9p21 ± 22. No estudo de Mahale (2000) com CCE intrabucal induzido por hábito de mascar fumo, a LOH nessa região esteve presente em 71% dos casos (ISHWAD *et al.*, 1996; MAHALE; SARANATH, 2000).

Além disso a LOH no 9p vem sendo muito estudada para a progressão de leucoplasia bucal (lesão cancerizável intrabucal) para o CCE intrabucal. Vários estudos demonstraram que a LOH na região 9p21 estava associada com o aumento do risco do desenvolvimento do CCE intrabucal (FOY *et al.*, 2013; PARTRIDGE *et al.*, 2000; ZHANG, L. *et al.*, 2012). Uma coorte prospectiva de 296 pacientes com leucoplasias bucais com displasias leve / moderada demonstrou que a LOH na região 9p pode

umentar em 22,6 vezes o risco da transformação maligna em CCE intrabucal (ZHANG, L. *et al.*, 2012).

Vários estudos demonstram que a LOH na região 9p para os tumores de pele, associado com a perda ou inativação do gene *CDKN2A* parecem estar envolvidos no processo da transformação maligna desses tumores. A média da FAL desses tumores foi de 52% em pelo menos um marcador microssatélite da região 9p (HAPPLE, 1999; KUSHIDA; MIKI; OHMORI, 1999; SARIDAKI *et al.*, 2003). Porém estudos que tentaram relacionar a LOH dessa região na progressão de ceratose actínica (lesão cancerizável de pele) para o CCE de pele apresentam dados conflitantes na literatura (HAPPLE, 1999; KUSHIDA *et al.*, 1999; SARIDAKI *et al.*, 2003).

No presente estudo, a LOH na região 9p em pelo menos um marcador foi presente tanto nos casos de QA quanto nos casos de CCEL (43,8% e 64,7%, respectivamente), mostrando que alterações nessa região podem fazer parte do processo da iniciação e/ou progressão tumoral nos cânceres de lábio. Não foram observadas, porém, diferenças estatísticas entre as duas lesões, nem feito um estudo de progressão da QA para a CCEL.

Em outro trabalho, foram utilizados também os marcadores D9S162 e o D9S171 (9p). A FAL no CCE de pele para o marcador D9S162 foi de 37%, e para os casos de ceratose actínica de pele de 20%. No presente estudo, os resultados encontrados foram de 33% e 10% respectivamente. Para o marcador D9S171, a FAL encontrada também foi bem próxima a encontrada no presente estudo (MORTIER *et al.*, 2002). Quando comparados os estudos de LOH em CCE de pele, CCE intrabucal e o presente estudo, é possível observar que a LOH nessa região 9p21 é variável, dependendo do tipo do estudo conduzido e dos marcadores utilizados para essa região. Outro fator importante é que existem diferentes técnicas da avaliação da LOH, sendo que a que foi utilizada nesse presente estudo é uma das mais específicas. Além disso, não foi possível estabelecer que

o acúmulo de LOH em QA seria suficiente para a progressão destas ao CCEL, já que a porcentagem de LOH na região 9p21 para ambas as lesões foi próxima. Porém, é possível inferir que a LOH nessa região é um evento presente tanto no CCEL quanto na QA.

O gene *PTCH*, homólogo humano do gene supressor de tumor PTC, foi descrito e mapeado no cromossomo 9q22.3-q31 (HAHN *et al.*, 1996; JOHNSON *et al.*, 1996) na mesma região onde o locus da síndrome do carcinoma nevóide de células basais (*Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome* - NBCCS) foi também mapeado. O gene *PTCH* pode desempenhar uma função relevante na patogênese de outros tipos de tumores. Vários estudos recentes demonstraram que a presença de mutações no *PTCH* dos pacientes com NBCCS está presente também em tumores esporádicos como carcinoma de células basais. Como um dos principais fatores etiológicos do NBCCS é também a radiação UV, é possível que os pacientes portadores de CCEL possuam alterações moleculares no locus deste gene (FARIAS *et al.*, 2012; GAILANI *et al.*, 1996; HAHN *et al.*, 1996; JOHNSON *et al.*, 1996). Em seu estudo, Cabral (2011) utilizou vários marcadores de microssatélite das regiões 6p e 9q22 em 8 casos de ceratose actínica e 24 CCE de pele. Entre os marcadores, foi utilizado o D9S287, marcador próximo a região do *PTCH*, tendo sido esse mesmo marcador utilizado também em nosso estudo. Os resultados mostraram que a LOH nessa região foi incomum para ambas as lesões, sendo detectada somente em um caso de ceratose actínica (CABRAL *et al.*, 2011). Em um estudo que avaliou a LOH em cânceres de pele (CCE, CBC e melanoma) a LOH na região 9q21-q22 esteve presente. As maiores taxas de LOH em 9q, 9p e 17q foram encontrados em ceratose actínica, ao invés de em CCEs invasivos (KANELLOU *et al.*, 2008). No presente estudo, apesar de não ser estatisticamente significativa, a LOH nesse marcador foi mais frequente nos casos de QA (30,8%) sendo identificado em somente um caso de CCEL. Portanto, alterações nessa região poderiam representar um evento inicial da transformação da mucosa normal

em QA, porém, após essa transformação, essas alterações não influenciariam o processo da carcinogênese.

Na região cromossômica 17p13.1, além do marcador para a região do gene *TP53*, encontra-se outro marcador de microssatélite, o AFM238WF2. Este é um marcador para o locus *CHRN1* que se encontra próximo à região do *TP53*. Vários estudos que avaliaram essas regiões em ceratose actínica de pele demonstraram ser comum a LOH nessas regiões, fato que não ocorre com tanta frequência nos casos de CCE de pele (CABRAL *et al.*, 2011; KUSHIDA *et al.*, 1999). Por exemplo, a LOH do *TP53* no locus 17p13.1 é um evento precoce na evolução do tumor e é consistente com a transição de QA para os CCE de pele. No presente estudo, as taxas de LOH nessa região foram parecidas nas duas lesões (25% para a QA e 29% para o CCEL) mostrando ser também uma região alterada nesses casos.

Em estudos de LOH comparando as leucoplasias bucais aos CCE intrabucais, os autores afirmam que o aumento de LOH pode estar relacionado com o aumento da transformação maligna, independentemente da graduação histopatológica das displasias (CALIFANO *et al.*, 1996; ROSIN *et al.*, 2000; ZHANG, Y. *et al.*, 2010). O presente estudo demonstrou que a porcentagem de casos com LOH foi estatisticamente semelhante entre os grupos, apesar da diferença numérica ser considerável (88% x 56,3%) Também não houve associação estatística entre nenhuma das variáveis clinicopatológicas, mostrando que a LOH dessas regiões pode ser um evento independente. No presente estudo, vale destacar que dados fundamentais para a avaliação da exposição solar, como tipo de trabalho, tempo de exposição diária, e uso de protetores solares não eram incluídos nas fichas clínicas dos pacientes ou apresentavam dados incompletos. Esses dados poderiam ter sido importantes para uma possível associação da LOH com as características clínicas do paciente.

É importante frisar que todos os marcadores estudados neste presente trabalho, são marcadores intergênicos (nas regiões de microssatélite), e a LOH dessas regiões pode não significar, necessariamente, a inativação ou a modificação dos genes supressores de tumor codificados nessas regiões. Porém, essa identificação pode ajudar no entendimento do mecanismo de formação de tumores, podendo, no futuro, facilitar o desenvolvimento de marcadores de prognóstico genético e de alvos terapêuticos dessas lesões.

Foram também avaliadas as proteínas p53 e Ki-67. A imunodeteção da proteína p53 pode refletir um processo de instabilidade celular funcional. Além disso, o acúmulo da p53 pode indicar a presença de proliferação de células com danos no DNA (COX, 2012). CROSTHWAITE *et al.*, em 1995, estudaram, através da imunohistoquímica, a expressão da proteína p53 em 5 amostras de CCEL, QA, candidíase hiperplásica crônica e líquen plano, todos localizados no lábio. Todos os casos de CCEL e QA foram positivos para a p53. Diante desses dados, os autores sugeriram que a alta expressão da p53 poderia ser considerada como evento inicial na patogenia do câncer de lábio e que as células marcadas positivamente para p53 estariam relacionadas com a formação de tumores malignos (CROSTHWAITE *et al.*, 1996). A detecção da p53 vem sendo bastante estudada não só em lesões malignas, como também nas lesões precursoras, no intuito de prever a evolução e o comportamento dessas alterações o que é considerado por alguns autores como um bom fator prognóstico para essas lesões (CROSTHWAITE *et al.*, 1996; CRUZ *et al.*, 2000; DE PAULA *et al.*, 2009; SHIN *et al.*, 1994; SOUZA *et al.*, 2011).

No estudo de Balassiano (2004), sobre a expressão da p53 e do Ki-67 em QA e CCEL, todos os casos foram positivos para a marcação de ambas proteínas (sendo considerados positivos os casos que expressaram a proteína em mais de 10% das células alteradas). O presente estudo, apesar de não ter associação da imunodeteção da p53 com a LOH, percebe ou revela que a grande maioria dos casos apresentava uma marcação

acima de 75% dos núcleos celulares com a p53, tanto nos casos de CCEL, quanto de QA, o que pode demonstrar uma resposta ao dano genético irreversível (BALASSIANO, 2004).

A imunopositividade do Ki-67 demonstra uma alta atividade de proliferação tumoral nos casos estudados. Estudos mostram que essa alta atividade pode estar relacionada a um comportamento mais agressivo dos tumores e à caracterização de diversas neoplasias, como carcinoma de pulmão, mama, cabeça e pescoço (ANGIERO *et al.*, 2008; CIANCIO *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2003). Balassiano (2004) em seu estudo, demonstrou que em QA e CCEL houve uma alta expressão do Ki-67 (85% dos casos) (BALASSIANO, 2004). No presente estudo, não houve associação estatística significativa entre a marcação positiva dessa proteína e a LOH dos casos. Porém, foi demonstrada uma alta atividade proliferativa, tanto nos casos de CCEL, quanto nos casos de QA, demonstrando a provável instabilidade genética desses tumores e revelando o alto índice proliferativo em todas as lesões estudadas.

O gene supressor tumoral *TP53* é o gene mais frequentemente mutado em cânceres humanos. Embora a frequência de mutações em *TP53* na literatura varie entre 10 a 85 % (LAM, 1995) dependendo da lesão, na maioria das publicações, o índice de mutações é de aproximadamente 50 % (GIBBONS; BYERS; KURIE, 2014; LI, X.-L. *et al.*, 2015; PETITJEAN *et al.*, 2007). A maioria das variações genéticas em *TP53* encontradas no presente estudo foram alterações intrônicas, ou silenciosas, sendo que algumas delas não foram descritas ainda na literatura. Além disso, a grande maioria das amostras mostraram alterações de trocas de base nas regiões intrônicas que flaqueiam os éxons. Mutações somáticas, em regiões não codificadoras, são frequentes, entretanto pouco se sabe como variações não codificantes afetam o desenvolvimento do câncer (WEINHOLD *et al.*, 2014). No presente estudo, foram encontradas oito mutações intrônicas, sendo que

somente três já foram descritas na literatura. É descrito que a maioria dos polimorfismos de *TP53* ocorre em íntrons, sendo a consequência funcional da maior parte dos polimorfismos em uma única base (*Single Nucleotide Polymorphism* – SNPs) nessa região ainda desconhecida. Embora de localização não intrônica, o SNP mais extensivamente estudado no *TP53* é uma variação G / C na segunda posição do códon 72 no éxon 4, que leva a uma troca de aminoácidos (Arg72 Pro72) ou variantes da proteína (ALQUMBER *et al.*, 2014; FREED-PASTOR; PRIVES, 2012; GIBBONS *et al.*, 2014; OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010). No presente estudo, todas as amostras investigadas para essa região, apresentaram esse polimorfismo genético da troca da Prolina pela Arginina (c.215C>G - rs1042522), (p. P72R).

Diferenças étnicas acentuadas são observadas para este SNP72 (rs1042522), com a variante Arg72 sendo mais prevalente em caucasianos, e a variante Pro72 mais prevalente em chineses e afro-americanos (BECKMAN *et al.*, 1994; LANGEROD *et al.*, 2007). O resíduo 72, embora não conservado, está localizado dentro de uma região rica em Prolina e pode afetar a estrutura do domínio SH3 de ligação pontual da p53. Diferenças funcionais têm sido relatadas entre as variantes Arg72 e Pro72. Arg72 demonstrou ser mais eficaz na indução de apoptose, uma propriedade que se correlacionou com uma maior capacidade para interagir com *MDM2* (é um importante regulador negativo do supressor de tumor p53) e que facilita a exportação nuclear e localização mitocondrial (DUMONT *et al.*, 2003). Em contraste, a variante Pro72 foi descrita como mais eficaz na indução da paragem do ciclo celular (PIM; BANKS, 2004) e na reparação do DNA (SIDDIQUE; SABAPATHY, 2006). Para avaliar o impacto desse SNP em tumores avançados de CCE do trato aerodigestivo superior, o estudo de Sullivan (2004) mostrou que pacientes portadores da variante Arg72 tiveram uma resposta melhor à quimioterapia do que as que possuíam a variante selvagem Pro72 (SULLIVAN *et al.*, 2004). Assim, os estudos têm

tentado usar o SNP72 como fator prognóstico, entretanto, não há consenso na literatura quanto ao real valor prognóstico ou significado desse SNP (KOCHETHU *et al.*, 2006; PETITJEAN *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2005).

Mutações *nonsense* levam a uma parada da leitura do RNAm, alterando estrutura e a função da proteína, gerando muitas vezes a inativação da mesma. Em síntese, a inativação da proteína pode levar ao aumento da proliferação, instabilidade genômica e perda de importantes mecanismos de controle do ciclo celular (LANE, 1992). No presente estudo, foi encontrada uma alteração nonsense, no éxon 10, no códon 342 que foi predita como danosa. Essa mesma alteração já foi encontrada em casos de CBC e de CCE intrabucal (JAYARAMAN *et al.*, 2014; ZANARUDDIN *et al.*, 2013). De acordo com a base de dados de mutações da IARC, o códon 342 é uma região pouco frequente da ocorrência de mutações.

Mutações silenciosas, embora presentes em regiões codificantes do gene, são categorizadas como um evento “passenger”, ou mutações passageiras, uma vez que elas não modificam a sequência proteica, sendo portanto, consideradas funcionalmente irrelevantes, assim como as mutações intrônicas (WEINHOLD *et al.*, 2014). No presente trabalho, foram encontradas duas mutações silenciosas descritas na literatura, nas amostras congeladas de CCEL. E embora seu significado não seja claro, recentemente, tem sido proposto que mutações silenciosas poderiam afetar o tempo de tradução do RNAm, e conduzir a um processamento aberrante, o que resultaria num RNAm alterado, afetando assim a expressão do gene (SUPEK *et al.*, 2014).

As alterações em *TP53* mais frequentes em cânceres humanos são substituições de nucleotídeo único que levam à produção de uma proteína mutante que difere da proteína de tipo selvagem por um aminoácido (mutações *missense*). Ao todo, no presente estudo foram encontradas cinco mutações do tipo *missense*, tanto em amostras de CCEL quanto



de QA. Parte dessas mutações encontradas foi predita como danosa, o que indica que a estabilidade da proteína pode estar sendo afetada, alterando assim a sua função e capacidade de ligação. Os achados da imunohistoquímica mostraram, na maior parte dos casos de parafina, uma expressão positiva em mais de 10% das células marcadas para o clone mutado do p53, indicando que sua funcionalidade poderia estar alterada. Uma limitação do nosso estudo é o fato de ter ocorrido uma baixa amplificação das amostras de parafina para os éxons do *TP53*. Erros desse tipo talvez sejam devido à fragmentação do DNA, decorrente do processo de parafinização do tecido, bem como à fixação inadequada do mesmo.

Por fim, é possível inferir, através dos resultados obtidos, que mutações genéticas importantes podem já estar ocorrendo em lesões iniciais de QA. Apesar da maioria das mutações encontradas serem mutações intrônicas, e terem um papel incerto, é possível que essas alterações sejam importantes no processo de transformação da QA em CCEL, principalmente, porque algumas dessas alterações ainda não foram descritas na literatura. No presente estudo, nenhuma das alterações genéticas encontradas mostrou associação com as características clínicas da lesão, porém, acrescentam dados importantes na literatura. Vários estudos já mostram alterações genéticas nessas lesões e entendê-las se torna de fundamental importância para um correto tratamento e manejo desses pacientes.

## 7 Conclusões

A partir deste estudo, as seguintes conclusões podem ser feitas:

- A LOH nas regiões 9p, 9q e 17q é um evento presente em QA e CCEL;
- Não houve diferença significativa da frequência da LOH entre os grupos de lesões estudadas;
- A LOH parece não estar associada aos fatores clínicopatológicos e de imunexpressão investigados (p53 e Ki-67) nas amostras estudadas;
- A presença da LOH parece não estar associada com um comportamento agressivo do CCEL;
- Foram encontradas mutações intrônicas, descritas e não descritas na literatura no *TP53*, tanto nas amostras de QA e de CCEL;
- Foram encontradas mutações dos tipos *missense*, *silenciosas e nonsense* nos éxons do *TP53* em ambos os grupos de lesões.

## 8 Referências

ABREU, M. A. M. M. D. et al. Queilite actínica adjacente ao carcinoma espinocelular do lábio como indicador de prognóstico. **Rev Bras de Otorrino**, v. 72, p. 767-771, 2006.

AHMED, H. G.; IDRIS, A. M.; IBRAHIM, S. O. Study of oral epithelial atypia among Sudanese tobacco users by exfoliative cytology. **Anticancer Res**, v. 23, n. 2C, p. 1943-9, Mar-Apr 2003.

ALQUMBER, M. A. A. et al. Evaluating the Association between p53 Codon 72 Arg>Pro Polymorphism and Risk of Ovary Cancer: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 9,

ANGIERO, F. et al. Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. **Anticancer Res**, v. 28, n. 5a, p. 2535-9, Sep-Oct 2008.

ANTONIADES, D. Z. et al. Squamous cell carcinoma of the lips in a northern Greek population. Evaluation of prognostic factors on 5-year survival rate--I. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v. 31B, n. 5, p. 333-9, Sep 1995.

AYRES, S. Chronic Actinic Cheilitis. **JAMA**, v. 81, n. 14, p. 1183, 1923.

BAKER, S. R. Risk factors in multiple carcinomas of the lip. **Otolaryngol Head Neck Surg (1979)**, v. 88, n. 3, p. 248-51, May-Jun 1980.

BARNES, L.; ORGANIZATION, W. H.; CANCER, I. A. F. R. O. **Pathol And Genet of Head and Neck Tum**. IARC Press, 2005. ISBN 9789283224174.

BECKMAN, G. et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? **Hum Hered**, v. 44, n. 5, p. 266-70, Sep-Oct 1994.

BENTLEY, J. M.; BARANKIN, B.; LAUZON, G. J. Paying more than lip service to lip lesions. **Can Fam Physician**, v. 49, p. 1111-6, Sep 2003.

BERGER, A. H.; KNUDSON, A. G.; PANDOLFI, P. P. A continuum model for tumour suppression. **Nature**, v. 476, n. 7359, p. 163-169, 08/11/print 2011.

BETKA, J. Distant metastases from lip and oral cavity cancer. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec**, v. 63, n. 4, p. 217-21, Jul-Aug 2001.

BONGERS, V. et al. Value of p53 expression in oral cancer and adjacent normal mucosa in relation to the occurrence of multiple primary carcinomas. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v. 31b, n. 6, p. 392-5, Nov 1995.

CABRAL, L. S. et al. Genomic instability in human actinic keratosis and squamous cell carcinoma. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 66, n. 4, p. 523-8, 2011.

CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Res**, v. 56, n. 11, p. 2488-92, Jun 1 1996.

CAVALCANTE, A. S.; ANBINDER, A. L.; CARVALHO, Y. R. Actinic cheilitis: clinical and histological features. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 3, p. 498-503, Mar 2008.

CIANCIO, N. et al. Prognostic value of p53 and Ki67 expression in fiberoptic bronchial biopsies of patients with non small cell lung cancer. **Multidiscip Respir Med**, v. 7, n. 1, p. 29, 2012.

CLINGEN, P. H. et al. Induction of cyclobutane pyrimidine dimers, pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproducts, and Dewar valence isomers by natural sunlight in normal human mononuclear cells. **Cancer Res**, v. 55, n. 11, p. 2245-8, Jun 1 1995.

COX, D. P. p53 expression and mutation analysis of odontogenic cysts with and without dysplasia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 113, n. 1, p. 90-8, Jan 2012.

CROSTHWAITE, N. et al. p53 protein expression in malignant, pre-malignant and non-malignant lesions of the lip. **J Clin Pathol**, v. 49, n. 8, p. 648-53, Aug 1996.

CRUZ, I. B. et al. p53 immunoexpression in non-malignant oral mucosa adjacent to oral squamous cell carcinoma: potential consequences for clinical management. **The J of Pathol**, v. 191, n. 2, p. 132-137, 2000.

CZERNINSKI, R.; ZINI, A.; SGAN-COHEN, H. D. Lip cancer: incidence, trends, histology and survival: 1970-2006. **Br J Dermatol**, v. 162, n. 5, p. 1103-9, May 2010.

DARNTON, S. J. Demystified ... p53. **Mol Pathol**, v. 51, n. 5, p. 248-53, Oct 1998.

DE GRUIJL, F. R. Skin cancer and solar UV radiation. **Eur J Cancer**, v. 35, n. 14, p. 2003-9, Dec 1999.

DE OLIVEIRA RIBEIRO, A.; DA SILVA, L. C.; MARTINS-FILHO, P. R. Prevalence of and risk factors for actinic cheilitis in Brazilian fishermen and women. **Int J Dermatol**, v. 53, n. 11, p. 1370-6, Nov 2014.

DE PAULA, A. M. B. et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. **Oral Oncol**, v. 45, n. 9, p. 777-782, 9// 2009.

DE SANTANA SARMENTO, D. J. et al. Actinic cheilitis: clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. **Int J Dermatol**, v. 53, n. 4, p. 466-72, Apr 2014.

DE VISSCHER, J. G. et al. [Lip carcinoma. A review]. **Ned Tijdschr Tandheelkd**, v. 109, n. 10, p. 391-5, Oct 2002.

DOUGLASS, C. W.; GAMMON, M. D. Reassessing the epidemiology of lip cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 57, n. 6, p. 631-42, Jun 1984.

DUFRESNE, R. G., JR.; CURLIN, M. U. Actinic cheilitis. A treatment review. **Dermatol Surg**, v. 23, n. 1, p. 15-21, Jan 1997.

DUMONT, P. et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nat Genet**, v. 33, n. 3, p. 357-65, Mar 2003.

FARIAS, L. C. et al. Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. **Hum Pathol**, v. 43, n. 8, p. 1229-33, Aug 2012.

FIELD, J. K. et al. Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. **Br J Cancer**, v. 72, n. 5, p. 1180-8, Nov 1995.

FOWLER, M. H. et al. Malignant mixed tumors of the salivary gland: a study of loss of heterozygosity in tumor suppressor genes. **Mod Pathol**, v. 19, n. 3, p. 350-5, Mar 2006.

FOY, J. P. et al. Oral premalignancy: the roles of early detection and chemoprevention. **Otolaryngol Clin North Am**, v. 46, n. 4, p. 579-97, Aug 2013.

FREED-PASTOR, W. A.; PRIVES, C. Mutant p53: one name, many proteins. **Genes & Develop**, v. 26, n. 12, p. 1268-1286, June 15, 2012 2012.

GAILANI, M. R. et al. The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas. **Nat Genet**, v. 14, n. 1, p. 78-81, Sep 1996.

GERDES, J. et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer**, v. 31, n. 1, p. 13-20, Jan 15 1983.

GIBBONS, D. L.; BYERS, L. A.; KURIE, J. M. Smoking, p53 Mutation, and Lung Cancer. **MCR**, v. 12, n. 1, p. 3-13, 2014.

GLAVAC, D. et al. Low microsatellite instability and high loss of heterozygosity rates indicate dominant role of the suppressor pathway in squamous cell carcinoma of head and neck and loss of heterozygosity of 11q14.3 correlates with tumor grade. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 146, n. 1, p. 27-32, Oct 1 2003.

GOMES, C. C. et al. Assessment of TP53 mutations in benign and malignant salivary gland neoplasms. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41261, 2012.

GOMES, C. C.; FONSECA-SILVA, T.; GOMEZ, R. S. Evidence for loss of heterozygosity (LOH) at chromosomes 9p and 17p in oral granular cell tumors: a pilot study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 115, n. 2, p. 249-53, Feb 2013.

GRAVELAND, A. P. et al. Loss of heterozygosity at 9p and p53 immunopositivity in surgical margins predict local relapse in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 128, n. 8, p. 1852-9, Apr 15 2011.

HAHN, H. et al. Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. **Cell**, v. 85, n. 6, p. 841-51, Jun 14 1996.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000.

\_\_\_\_\_. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011.

HAPPLE, R. Loss of heterozygosity in human skin. **J Am Acad Dermatol**, v. 41, n. 2 Pt 1, p. 143-64, Aug 1999.

HASSON, O. Squamous cell carcinoma of the lower lip. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 6, p. 1259-62, Jun 2008.

HUSSEIN, M. R. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. **J Cutan Pathol**, v. 32, n. 3, p. 191-205, Mar 2005.

INCA. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. **Inst Nac de Câncer José Alencar Gomes da Silva** v. 1, p. 124, 2014.

ISHWAD, C. S. et al. Loss of heterozygosity of the short arm of chromosomes 3 and 9 in oral cancer. **Int J Cancer**, v. 69, n. 1, p. 1-4, Feb 20 1996.

JAYARAMAN, S. S. et al. Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. **J Invest Dermatol**, v. 134, n. 1, p. 213-20, Jan 2014.

JOHNSON, R. L. et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. **Science**, v. 272, n. 5268, p. 1668-71, Jun 14 1996.

KANELLOU, P. et al. Genomic instability, mutations and expression analysis of the tumour suppressor genes p14(ARF), p15(INK4b), p16(INK4a) and p53 in actinic keratosis. **Cancer Lett**, v. 264, n. 1, p. 145-61, Jun 8 2008.

KAUGARS, G. E. et al. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 88, n. 2, p. 181-6, Aug 1999.

KIM, S. K.; SONG, H. S.; KIM, Y. C. Topical photodynamic therapy may not be effective for actinic cheilitis despite repeated treatments. **Eur J Dermatol**, v. 23, n. 6, p. 917-8, Nov-Dec 2013.

KNUDSON, A. G., JR. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 4, p. 820-3, Apr 1971.

KOCHETHU, G. et al. Two germ line polymorphisms of the tumour suppressor gene p53 may influence the biology of chronic lymphocytic leukaemia. **Leuk Res**, v. 30, n. 9, p. 1113-8, Sep 2006.

KREPPEL, M. et al. Prognostic value of the sixth edition of the UICC's TNM classification and stage grouping for oral cancer. **J Surg Oncol**, v. 102, n. 5, p. 443-9, Oct 1 2010.

KUMAR, A. et al. Versatility of Abbe-Estlander Flap in Lip Reconstruction – A Prospective Clinical Study. **JCDR**, v. 8, n. 10, p. NC18-NC21, 10/20.



KUSHIDA, Y.; MIKI, H.; OHMORI, M. Loss of heterozygosity in actinic keratosis, squamous cell carcinoma and sun-exposed normal-appearing skin in Japanese: difference between Japanese and Caucasians. **Cancer Lett**, v. 140, n. 1-2, p. 169-75, Jun 1 1999.

LA VECCHIA, C. et al. Epidemiology and prevention of oral cancer. **Oral Oncol**, v. 33, n. 5, p. 302-12, Sep 1997.

LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 15-6, Jul 2 1992.

LANGEROD, A. et al. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 9, n. 3, p. R30, 2007.

LEE, D. J. et al. Multiple tumor-suppressor genes on chromosome 3p contribute to head and neck squamous cell carcinoma tumorigenesis. **Cancer Biol Ther**, v. 10, n. 7, p. 689-93, Oct 1 2010.

LEVINE, A. J.; MOMAND, J.; FINLAY, C. A. The p53 tumour suppressor gene. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 453-6, Jun 6 1991.

LI, X.-L. et al. p53 mutations in colorectal cancer- molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. **WJG**, v. 21, n. 1.

LI, Y.-C. et al. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. **Molec Biol and Evolution**, v. 21, n. 6, p. 991-1007, June 1, 2004 2004.

LINCOLN, E. A. Sun-induced skin changes. **Prim Care**, v. 27, n. 2, p. 435-45, Jun 2000.

LINDQVIST, C.; TEPPON, L. Epidemiological evaluation of sunlight as a risk factor of lip cancer. **Br J Cancer**, v. 37, n. 6, p. 983-9, Jun 1978.

LIU, M. et al. Predictive value of the fraction of cancer cells immunolabeled for proliferating cell nuclear antigen or Ki67 in biopsies of head and neck carcinomas to

identify lymph node metastasis: comparison with clinical and radiologic examinations. **Head Neck**, v. 25, n. 4, p. 280-8, Apr 2003.

LUNA-ORTIZ, K. et al. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. **Oral Oncol**, v. 40, n. 10, p. 992-9, Nov 2004.

MAHALE, A.; SARANATH, D. Microsatellite alterations on chromosome 9 in chewing tobacco-induced oral squamous cell carcinomas from India. **Oral Oncol**, v. 36, n. 2, p. 199-206, Mar 2000.

MAIN, J. H.; PAVONE, M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. **J Can Dent Assoc**, v. 60, n. 2, p. 113-6, Feb 1994.

MANGANARO, A. M.; WILL, M. J.; POULOS, E. Actinic cheilitis: a premalignant condition. **Gen Dent**, v. 45, n. 5, p. 492-4, Sep-Oct 1997.

MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU-FARMAKI, E.; KAYAVIS, I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Dis**, v. 10, n. 4, p. 212-6, Jul 2004.

MARTINS-FILHO, P. R.; DA SILVA, L. C.; PIVA, M. R. The prevalence of actinic cheilitis in farmers in a semi-arid northeastern region of Brazil. **Int J Dermatol**, v. 50, n. 9, p. 1109-14, Sep 2011.

MAY, P.; MAY, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7621-36, Dec 13 1999.

MELNIKOVA, V. O.; ANANTHASWAMY, H. N. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. **Mutat Res**, v. 571, n. 1-2, p. 91-106, Apr 1 2005.

MELO, M. R. et al. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jorn Bras de Patol e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 375-381, 2010.

MIGALDI, M. et al. Tumor cell proliferation and microsatellite alterations in human ameloblastoma. **Oral Oncol**, v. 44, n. 1, p. 50-60, Jan 2008.

MITCHELL, D. L. The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. **Photochem Photobiol**, v. 48, n. 1, p. 51-7, Jul 1988.

MOORE, S. et al. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. **Oral Dis**, v. 5, n. 3, p. 185-95, Jul 1999.

MORTAZAVI, H.; BAHARVAND, M.; MEHDIPOUR, M. Oral Potentially Malignant Disorders: An Overview of More than 20 Entities. **J of Dent Research, Dent Clinics, Dent Prospects**, v. 8, n. 1, p. 6-14, Winter.

MORTIER, L. et al. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16(INK4a) tumor suppressor. **Cancer Lett**, v. 176, n. 2, p. 205-14, Feb 25 2002.

MURALI, A. et al. Loss of heterozygosity of D9S162: molecular predictor for treatment response in oral carcinoma. **Oral Oncol**, v. 47, n. 7, p. 571-6, Jul 2011.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin**, v. 52, n. 4, p. 195-215, Jul-Aug 2002.

NG, I. O. et al. Microsatellite alterations in squamous cell carcinoma of the head and neck - clustering of loss of heterozygosity in a distinct subset. **Oral Oncol**, v. 36, n. 5, p. 484-90, Sep 2000.

NUNES, D. N.; KOWALSKI, L. P.; SIMPSON, A. J. Detection of oral and oropharyngeal cancer by microsatellite analysis in mouth washes and lesion brushings. **Oral Oncol**, v. 36, n. 6, p. 525-8, Nov 2000.

NYLANDER, K.; DABELSTEEN, E.; HALL, P. A. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Jour of Oral Pathology & Medicine**, v. 29, n. 9, p. 413-425, 2000.

OCHSENIUS, G. et al. [A retrospective study of 232 cases of lip cancer and pre cancer in Chilean patients. Clinical-histological correlation]. **Rev Med Chil**, v. 131, n. 1, p. 60-6, Jan 2003.

OLIVEIRA ALVES, M. G. et al. Study of MDM2 and SUMO-1 expression in actinic cheilitis and lip cancer. **Arch Dermatol Res**, v. 306, n. 9, p. 837-41, Nov 2014.

OLIVEIRA, L. R. D.; RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLOTO, S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **Jorn Bras de Patol e Medicina Laboratorial**, v. 42, p. 385-392, 2006.

OLIVIER, M. et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Hum Mutat**, v. 19, n. 6, p. 607-14, Jun 2002.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 1, p. a001008, Jan 2010.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 1, p. a001008, 2010.

PARKIN, D. M. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet Oncol**, v. 2, n. 9, p. 533-43, Sep 2001.

PARTRIDGE, M. et al. A case-control study confirms that microsatellite assay can identify patients at risk of developing oral squamous cell carcinoma within a field of cancerization. **Cancer Res**, v. 60, n. 14, p. 3893-8, Jul 15 2000.

PATIL, S.; MAHESHWARI, S. Prevalence of lip lesions in an Indian population. **Journ of Clinic and Experimet Dentistry**, v. 6, n. 4, p. e374-e378, 10/01.

PEREA-MILLA LOPEZ, E. et al. Lifestyles, environmental and phenotypic factors associated with lip cancer: a case-control study in southern Spain. **Br J Cancer**, v. 88, n. 11, p. 1702-7, Jun 2 2003.

PETITJEAN, A. et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Hum Mutat**, v. 28, n. 6, p. 622-9, Jun 2007.

PIM, D.; BANKS, L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. **Int J Cancer**, v. 108, n. 2, p. 196-9, Jan 10 2004.

PIÑERA-MARQUES, K. et al. Actinic lesions in fishermen's lower lip: clinical, cytopathological and histopathologic analysis. **Clinics**, v. 65, n. 4, p. 363-367.

PITOT, H. C. Animal models of neoplastic development. **Dev Biol (Basel)**, v. 106, p. 53-7; discussion 57-9, 143-60, 2001.

POGODA, J. M.; PRESTON-MARTIN, S. Solar radiation, lip protection, and lip cancer risk in Los Angeles County women (California, United States). **Cancer Causes Control**, v. 7, n. 4, p. 458-63, Jul 1996.

RAHN, R. O. Pyrimidine dimers: effect of temperature on photoinduction. **Science**, v. 154, n. 3748, p. 503-4, Oct 28 1966.

RENA, W. et al. Surgical management of Squamous Cell Carcinoma of the lower lip: An experience of 109 cases. **Med Oral, Patol Oral y Cirugía Bucal**, v. 19, n. 4, p. e398-e402, 03/08.

RIBEIRO, G. R. et al. Repetitive DNA alterations in human skin cancers. **J Dermatol Sci**, v. 36, n. 2, p. 79-86, Nov 2004.

RODOLICO, V. et al. Lymph node metastasis in lower lip squamous cell carcinoma in relation to tumour size, histologic variables and p27Kip1 protein expression. **Oral Oncol**, v. 40, n. 1, p. 92-8, Jan 2004.

ROSIN, M. P. et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 2, p. 357-62, Feb 2000.

ROWLEY, H. et al. Definition of a tumor suppressor gene locus on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the head and neck by means of microsatellite markers. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 122, n. 5, p. 497-501, May 1996.

SALGARELLI, A. C. et al. Treatment of lower lip cancer: an experience of 48 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 34, n. 1, p. 27-32, Jan 2005.

SARGERAN, K. et al. Delayed diagnosis of oral cancer in Iran: challenge for prevention. **Oral Health Prev Dent**, v. 7, n. 1, p. 69-76, 2009.

SARIDAKI, Z. et al. Mutational analysis of CDKN2A genes in patients with squamous cell carcinoma of the skin. **Br J Dermatol**, v. 148, n. 4, p. 638-48, Apr 2003.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Dis**, v. 15, n. 6, p. 388-99, Sep 2009.

SHAH, A. Y.; DOHERTY, S. D.; ROSEN, T. Actinic cheilitis: a treatment review. **Internat J of Dermatol**, v. 49, n. 11, p. 1225-1234, 2010.

SHIN, D. M. et al. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. **Cancer Res**, v. 54, n. 2, p. 321-6, Jan 15 1994.

SIDDIQUE, M.; SABAPATHY, K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. **Oncogene**, v. 25, n. 25, p. 3489-500, Jun 15 2006.

SILVA, F. D. D. et al. Estudo da prevalência de alterações labiais em pescadores da ilha de santa catarina. **Rev Odonto Ciência** v. 21, n. n. 51, jan./mar. 2006 p. 6, jan./mar. 2006 2006.

SINHA, R. P.; HADER, D. P. UV-induced DNA damage and repair: a review. **Photochem Photobiol Sci**, v. 1, n. 4, p. 225-36, Apr 2002.

SINHA, S. et al. Frequent deletion and methylation in SH3GL2 and CDKN2A loci are associated with early- and late-onset breast carcinoma. **Ann Surg Oncol**, v. 15, n. 4, p. 1070-80, Apr 2008.

SMITH, M. L. et al. p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. **Mol Cell Biol**, v. 20, n. 10, p. 3705-14, May 2000.

SOUZA, R. L. et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 16, n. 6, p. e757-62, Sep 2011.

SPAFFORD, M. F. et al. Detection of head and neck squamous cell carcinoma among exfoliated oral mucosal cells by microsatellite analysis. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 3, p. 607-12, Mar 2001.

SUGERMAN, P. B.; SAVAGE, N. W. Oral cancer in Australia: 1983-1996. **Aust Dent J**, v. 47, n. 1, p. 45-56, Mar 2002.

SULLIVAN, A. et al. Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy in vitro and in vivo. **Oncogene**, v. 23, n. 19, p. 3328-37, Apr 22 2004.

SUPEK, F. et al. Synonymous Mutations Frequently Act as Driver Mutations in Human Cancers. **Cell**, v. 156, n. 6, p. 1324-1335, 2014.

VAHTSEVANOS, K. et al. Distant bone metastases from carcinoma of the lip: a report of four cases. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, n. 2, p. 180-5, Feb 2007.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 317-23, Apr-May 2009.

VERMA, R. S.; TRIANTAFILLOU, N. G. Oncogenetic map of human genome. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 100, n. 1, p. 88-90, Jan 1 1998.

WARNAKULASURIYA, K. A.; JOHNSON, N. W. Association of overexpression of p53 oncoprotein with the state of cell proliferation in oral carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 23, n. 6, p. 246-50, Jul 1994.

WEINHOLD, N. et al. Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer. **Nat Genet**, v. 46, n. 11, p. 1160-1165, 11//print 2014.

XU, Y. et al. p53 Codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 20, p. 7328-33, Oct 15 2005.

YARDIMCI, G. et al. Precancerous lesions of oral mucosa. **W Jour of Clinic Cases : WJCC**, v. 2, n. 12, p. 866-872, 12/16.

ZANARUDDIN, S. N. et al. Common oncogenic mutations are infrequent in oral squamous cell carcinoma of Asian origin. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80229, 2013.

ZHANG, L. et al. Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 5, n. 9, p. 1081-9, Sep 2012.

ZHANG, Y. et al. Loss of chromosome 9p21 and decreased p16 expression correlate with malignant gastrointestinal stromal tumor. **World J Gastroenterol**, v. 16, n. 37, p. 4716-24, Oct 7 2010.



## Anexo I – Termo de aprovação do COEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Estudo da perda de heterozigosidade em Queilite actínica e Carcinoma de Células Escamosas de Lábio

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 01368212.4.0000.5149

**Pesquisador:** Ricardo Santiago Gomez

**Instituição:** Faculdade de Odontologia (UFMG)

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 99.057

**Data da Relatoria:** 19/09/2012

**Apresentação do Projeto:**

O lábio é considerado uma região de freqüente desenvolvimento de carcinoma, correspondendo a 30% dos carcinomas da cavidade oral e 2% de todas as neoplasias humanas. Embora vários estudos pretendessem elucidar a patogênese do CCEL, os mecanismos moleculares envolvidos na ocorrência do CCEL necessitam ser mais bem elucidados. A Queilite actínica é uma lesão cancerizável do lábio que apresenta fatores etiológicos e clínicos semelhantes aos do CCEL. A perda de heterozigosidade (LOH - Loss of Heterozygosity) é definida como a perda de um alelo em um locus heterozigoto constitucional. Alterações nessas regiões têm sido usadas como marcadores clonais e na detecção de células tumorais entre as células normais. Diferentemente dos casos de carcinoma de células escamosas da cavidade bucal e da cabeça e pescoço, onde o principal fator de risco conhecido é o uso do tabaco, estudos mostram que a etiologia do CCEL está altamente relacionada à exposição aos raios UV, já que estes são importantes fatores alteradores do DNA. A queilite actínica é uma lesão cancerizável do lábio que pode sofrer transformação maligna e originar um CCEL. Esta lesão também tem como principal fator etiológico a exposição crônica ao sol. Pouco se sabe sobre a patogênese molecular da queilite actínica e do CCEL. Trata-se de um estudo transversal-retrospectivo que envolverá a coleta e análise de dados clínicos e amostras de tumor de uma amostra de conveniência de pacientes portadores de CCEL e de queilite actínica, atendidos nas clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Somente os pacientes que autorizarem a utilização de seus dados e que assinarem o termo de consentimento serão selecionados e terão seus dados analisados. Pretende-se neste estudo verificar se a LOH nas regiões estudadas são eventos freqüentes no CCEL e se a queilite actínica compartilha das mesmas alterações moleculares do CCEL. Pretende-se ainda investigar a associação entre a LOH em locus específicos e fatores prognósticos específicos do CCEL, como o tamanho do tumor, presença de metástase regional e tempo de sobrevida livre de doença. Os espécimes utilizados no estudo, bem como os dados clínicos serão obtidos dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais no período entre os anos de 2000 e 2010. Todas as características clinicopatológicas como sexo, idade, cor da pele, tamanho do tumor, presença de metástase regional e estadiamento TNM (Tamanho do tumor, presença de nodos metastáticos e presença de metástases à distância) serão devidamente coletadas das fichas clínicas. Por se tratar de um estudo retrospectivo, os pacientes envolvidos serão contatados para assinarem o TCLE. Serão incluídos no estudo materiais referentes ao tumor primário removidos cirurgicamente que tenham sido fixados e incluídos em blocos de parafina. Serão excluídos os casos que não apresentarem dados clínicos completos, material insuficiente para o preparo das lâminas ou para as análises propostas. PERDA DE HETEROZIGOSIDADE - Loss of heterozygosity (LOH): A análise da LOH será realizada a partir da identificação e amplificação de regiões genômicas específicas denominadas de marcadores de microsatélite e posteriormente analisados em aparelho seqüenciador ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Inicialmente, cada seqüência será amplificada pela Reação

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad 51 30335

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: 3134-0945

Fax: 3134-0945

E-mail: coep@proq.ufmg.br; coep@reitoria.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) com um par de oligonucleotídeos (primers) descritos abaixo, marcados com os agentes fluorescentes. Os produtos da PCR serão verificados através da eletroforese, em gel de poliacrilamida 6,5%, corados pela prata e posteriormente analisados por eletroforese capilar em sequenciador automático. Os marcadores a serem utilizados compreenderão: D3S1029, D3S1293, D3S3528, STAG1, D3S1549, D9S157, D9S162, D9S171, D9S287, D9S127, D9S252, D11S1369, D11S1883, AFM238WF2, P53, REN52549, REN52034, REN52291. A proporção entre os alelos normais e os alelos da lesão será analisada conforme os critérios descritos por Van Houten et al. (2000). Tamanho amostra 30. Os espécimes utilizados no estudo serão obtidos dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Primeiramente, serão recuperadas as fichas clínicas de cada paciente para obtenção dos dados clínicos. Os pacientes envolvidos serão contatados para assinarem o TCLE. Em seguida, as lâminas histológicas referentes a cada caso serão avaliadas para confirmação do diagnóstico e para selecionarmos aquelas que correspondem a áreas de tumor e de tecido normal. E por fim, os blocos de parafina correspondentes a cada lâmina histológica selecionada serão recuperados. Serão então realizados cortes histológicos específicos, para a extração do material parafinado. Os resultados obtidos serão submetidos à análise estatística apropriada utilizando o programa estatístico SPSS para Windows versão 16.0

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Primário:

Investigar em CCEL e em querite actínica a perda de heterocigosidade (do inglês loss of heterocigosity-LOH) em regiões que previamente demonstraram LOH em outras neoplasias epiteliais malignas, incluindo carcinoma de células escamosas intra-oral. Estas regiões incluem regiões de genes supressores de tumor (3p21. 2, 3p24.3, 9p22, 9p22-p13, 9p22-p21, 11q13.4, 11p15.5, 17p13.1, 17p13.1), região do PTCH (9q21-33, 9q22-32, 9q32-1), frequentemente alterados em carcinoma basocelular de pele, e outras regiões cromossômicas cujas alterações foram recentemente demonstradas em diversas neoplasias malignas humanas (por exemplo, o locus dos genes STAG1 e STAG2).

##### Objetivo Secundário:

Avaliar se existe relação entre os fatores clínico-patológicos com a LOH em algum dos marcadores do presente estudo. Avaliar se existe alguma relação da frequência de perda alélica do tumor com a sobrevivência dos pacientes acometidos pelo CCEL.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

##### Riscos:

A pesquisa não oferece nenhum risco ao paciente, uma vez que serão utilizados blocos de material parafinado obtidos dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Minas Gerais. Além disso, os pesquisadores comprometem-se em preservar o material utilizado na pesquisa, a fim de que haja material para futuros estudos e/ou revisão de caso, caso se faça necessário. Desta forma, nenhum paciente será submetido a qualquer procedimento cirúrgico adicional que não esteja relacionado especificamente com o seu diagnóstico e plano de tratamento.

##### Benefícios:

Quanto aos benefícios, este trabalho poderá contribuir futuramente para a identificação de possíveis marcadores de prognóstico para pacientes acometidos pelo carcinoma de células escamosas de lábio e pela querite actínica. Ainda, contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares associados à carcinogênese de lábio.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é relevante, executável e justificado. Está bem fundamentado e será desenvolvido por meio de um estudo transversal-retrospectivo que envolverá a coleta e análise de dados clínicos e amostras de tumor de uma amostra de conveniência de pacientes portadores de CCEL e de querite actínica, atendidos nas clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Os sujeitos da pesquisa, critérios de exclusão e inclusão e o processo de análise e

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º And 30305

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: 3134-0945 Fax: 3134-0945

E-mail: coep@proq.ufmg.br; coep@reitoria.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



tratamento dos dados estão bem descritos.

O estudo contribuirá para identificação de possíveis marcadores de prognóstico para pacientes acometidos pelo carcinoma de células escamosas de lábio e pela queilite actínica. Ainda, contribuir para a elucidação dos mecanismos moleculares associados à carcinogênese de lábio.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados:

TCLE para os humanos que serão recrutados

Folha de Rosto

Termo de compromisso dos pesquisadores

Parecer consubstanciado da Câmara Departamental

**Recomendações:**

Diante do exposto, s.m.j., sou pela aprovação do projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 17 de Setembro de 2012

---

Assinado por:  
Maria Teresa Marques Amaral

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad. Sl 3005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: 3134-0945 Fax: 3134-0945

E-mail: [ceep@ppq.ufmg.br](mailto:ceep@ppq.ufmg.br); [ceep@reitoria.ufmg.br](mailto:ceep@reitoria.ufmg.br)

**Anexo II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), de uma pesquisa:

**TÍTULO DA PESQUISA:** Estudo da perda de heterozigosidade em Queilite actínica e Carcinoma de Células Escamosas de Lábio

**PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:** / Gefter Correa / Carolina Cavaliéri Gomes (orientadora). Telefones: (31) 3409-2477

Esta pesquisa tem como finalidade compreender melhor mecanismos genéticos envolvidos para o desenvolvimento do principal tipo de câncer que ocorre no lábio: chamado de “carcinoma de células escamosas”. Durante o tratamento da sua doença, foi necessário realizar uma cirurgia para a remoção deste tipo de tumor. Este tumor removido está armazenado em laboratório. Caso você queira participar da pesquisa, nós usaremos uma parte deste tumor nas nossas análises. Essas análises não afetam e nem prejudicam o diagnóstico, tratamento e/ou acompanhamento da sua doença e todas as informações referentes à sua doença serão sigilosas. Esclarecemos que você não será remunerado por participar desta pesquisa e não terá que pagar nada. Se você não aceitar participar, você não será penalizado(a) de forma alguma. Em caso de dúvida, você poderá procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Av. Antônio Carlos, 6677, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005; 3409-4592).

Após ser esclarecido(a) sobre as informações, se aceitar fazer parte desta pesquisa, assine este documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

**TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO:**

Li e entendi as informações fornecidas. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador responsável sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como dos possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

**PACIENTE E/OU RESPONSÁVEL:**

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

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

**PESQUISADOR:**

Nome: Gefter Thiago Batista Correa

## Apêndice 1

### Protocolo de extração de DNA de parafina

#### Desparafinização:

- 1) Aquecimento do xilol (Merck) a 65° C no banho seco;
- 2) No tecido acondicionado no tubo, foram adicionados 1000 µl de xilol aquecido ao tecido (1° banho), em seguida o tecido era agitado em um vórtex;
- 3) Repouso da solução (tecido parafinado + xilol) por 10 min no banho seco a 65° C → vórtex;
- 4) Centrifugação à temperatura ambiente por 1 minuto 15.000 rcf;
- 5) Remoção do xilol e repetição dos passos 2-5 em quantos banhos fossem necessários para a remoção da parafina (normalmente, 4 banhos foram suficientes).

#### Ressuspensão:

- 1) Após os banhos de xilol para remoção da parafina, o tecido foi ressuspense em 1.000 µl etanol 95% (preparado com etanol Merck + água miliQ);
- 2) Homogeneização e centrifugação do mix por 2 min 15.000 rcf;
- 3) Remoção do sobrenadante;
- 4) Ressuspensão do pellet em 1.000 µl de etanol 70% (preparado com Etanol Merck + água miliQ);
- 5) Homogeneização e centrifugação por 2 min 15.000 rcf;
- 6) Remoção do sobrenadante e secagem do álcool residual em temperatura ambiente com a tampa do eppendorf aberta por 15 minutos.

#### Digestão enzimática:

- 1) Após a secagem, ressuspensão do pellet em 180 µl de ATL Buffer + 20 µl de Proteinase K (fornecidos pelo kit);
- 2) Incubação no banho seco a 56 °C até a lise completa do tecido (normalmente, o tecido ficava incubado *overnight* para sua lise completa).

## Extração do DNA

- 1) Incubação a 90°C por 1 hora (Este passo tinha como objetivo reaver parcialmente os ácidos nucleicos modificados pelo formaldeído);
- 2) Centrifugação por 1 min a 15.000 rcf;
- 3) Adição de 200 µl de Buffer AL + 200 µl de Etanol 100% → vórtex;
- 4) Centrifugação por 1min a 15.000 rcf;
- 5) Transferência do conteúdo para a coluna Min Elute QIamp sem molhar a borda;
- 6) Centrifugação por 1 min a 15.000 rcf;
- 7) Descarte do líquido e adição 500 µl de Buffer AW1;
- 8) Centrifugação por 1 min a 15.000 rcf;
- 9) Descarte do líquido e adição 500 µl de Buffer AW2;
- 10) Centrifugação por 1 min a 15.000 rcf;
- 11) Descarte do líquido;
- 12) Centrifugação por 5 min a 15.000 rcf;
- 13) Descarte do líquido com cuidado para não molhar a membrana;
- 14) Transferir a coluna para um micro tubo de 1.5 ml que irá receber o DNA eluído;
- 15) Ressuspensão com 50 µl de Buffer ATE
- 16) Repouso do buffer em contato com a membrana por 10 minutos à temperatura ambiente;
- 17) Centrifugação por 5 minutos a 15.000 rcf;
- 18) Repetição dos passos 14-17 para obter a 2ª e 3ª extrações, eluindo sempre com um volume menor que a primeira.

Em seguida, foi realizada a quantificação e a avaliação do grau de pureza do DNA, utilizando o espectrofotômetro *Nanodrop 2000* (Thermo scientific, Wilmington, DE, EUA).

## Apêndice 2

### Protocolo de extração de DNA de tecido congelado

Inicialmente o tecido é seccionado e macerado. Em seguida, é colocado esse tecido em um microtubo e inicia-se a digestão enzimática do mesmo.

#### Digestão enzimática:

- 3) Após a secagem, ressuspensão do pellet em 180 µl de ATL Buffer + 20 µl de Proteinase K (fornecidos pelo kit);
- 4) Incubação no banho seco a 56 °C até a lise completa do tecido (normalmente, o tecido ficava incubado *overnight* para sua lise completa).

#### Extração do DNA

- 19) Centrifugação por 1 min a 15.000 rcf;
- 20) Adição de 200 µl de Buffer AL + 200 µl de Etanol 100% → vórtex;
- 21) Centrifugação por 1min a 15.000 rcf;
- 22) Transferência do conteúdo para a coluna Min Elute QIamp sem molhar a borda;
- 23) Centrifugação por 1 min a 15.000 rcf;
- 24) Descarte do líquido e adição 500 µl de Buffer AW1;
- 25) Centrifugação por 1 min a 15.000 rcf;
- 26) Descarte do líquido e adição 500 µl de Buffer AW2;
- 27) Centrifugação por 1 min a 15.000 rcf;
- 28) Descarte do líquido;
- 29) Centrifugação por 5 min a 15.000 rcf;
- 30) Descarte do líquido com cuidado para não molhar a membrana;
- 31) Transferir a coluna para um micro tubo de 1.5 ml que irá receber o DNA eluído;
- 32) Ressuspensão com 50 µl de Buffer ATE;
- 33) Repouso do buffer em contato com a membrana por 10 minutos à temperatura ambiente;
- 34) Centrifugação por 5 minutos a 15.000 rcf;
- 35) Repetição dos passos 14-17 para obter a 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> extrações, eluindo sempre com um volume menor que a primeira.

Em seguida, foi realizada a quantificação e a avaliação do grau de pureza do DNA, utilizando o espectrofotômetro *Nanodrop 2000* (Thermo scientific, Wilmington, DE, EUA).



### Apêndice 3

#### Protocolo de Imunohistoquímica:

1. Desparafinização em três passagens de xilol e hidratação em cadeia descendente de etanol (100%, 90% e 70%);
2. Recuperação dos epitopos antigênicos; A recuperação antigênica foi realizada em panela a vapor (Cuisinart Convection Steamer, New Jersey, EUA), por 30 minutos, com ácido cítrico, pH 6.0. 4. Após o resfriamento, alcançando equilíbrio térmico com o meio ambiente, lavagem em cinco banhos de água destilada;
5. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
6. Bloqueio da peroxidase endógena com solução de metanol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% em dois banhos de 5 minutos;
7. Incubação com o anticorpo primário (p53 – 1:50 e ki-67 – 1:100);
8. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
9. Incubação em anticorpo secundário. (EnVision, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA)
10. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
13. Incubação com tetrahidrocloridrato de diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical Co. St. Louis, USA) e, em seguida, 5 banhos de água destilada;
14. Contracoloração com hematoxilina de Mayer por 2 minutos;
15. Rápida passagem em solução aquosa de hidróxido de amônio e, em seguida, 5 banhos de água destilada;
16. Desidratação em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e três vezes a 100%), diafanização em três banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Tissue-Mount™ (TissueClear® based medium).

## Apêndice 4

**Detection of TP53 mutations by direct sequencing**

(IARC protocol, 2010 update)

**PCR conditions**

PCR conditions for amplifying genomic DNA sequences within exons 2-11 of human TP53 gene are summarized in the following table. Depending on the quality of your DNA template, you may use primer pairs that amplify large (good DNA quality) or small (poor DNA quality) fragments. Nucleotides **highlighted in yellow** have been described as site of polymorphisms (should not affect PCR according to our experience).

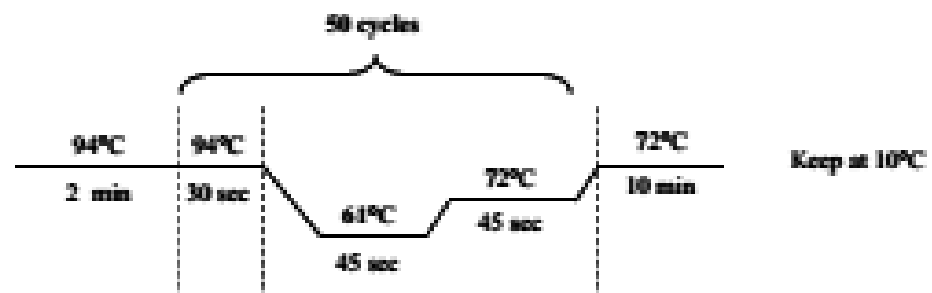
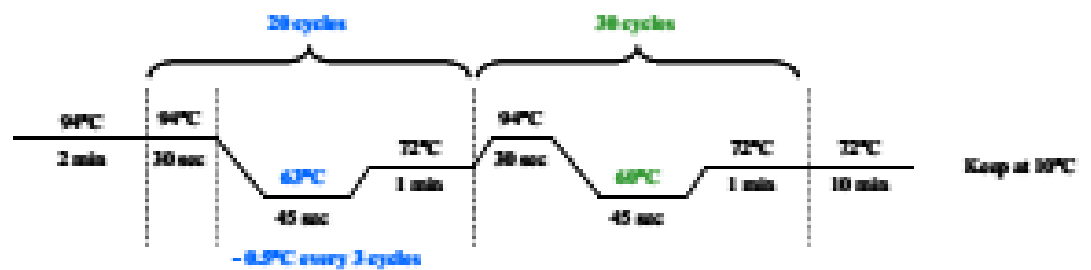
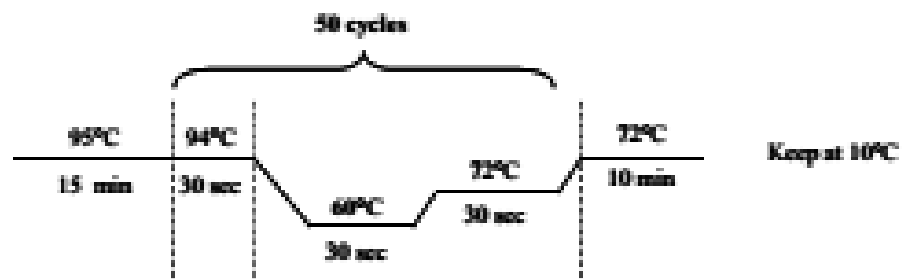
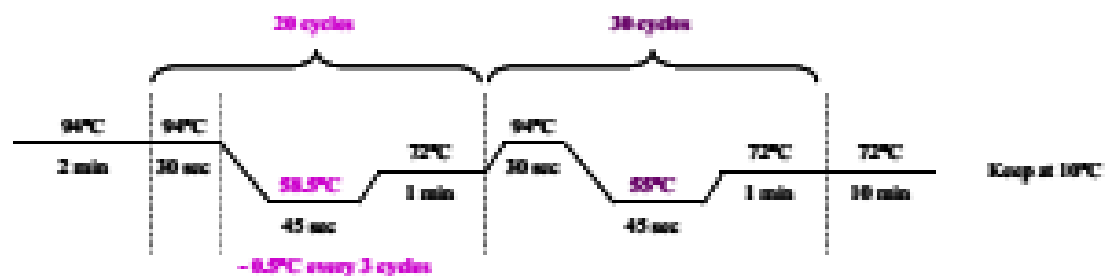
IARC code	Primer pairs (5' → 3')	Direction	Region amplified	Product length	PCR program	PCR mix
P-559 P-E3RI	tctcatgctggatcccact agtcaga <b>g</b> gaccagggtcctc	F R	Exons 2-3	344 bp	A or B	1
P-329 P-330	tgctcttttcaccocat <b>g</b> tac atacggccaggcattgaagt	F R	Exon 4	353 bp	B	1
P-326 P-327	tgaggacctggctcctctgac agaggaatcccaaatgcca	F R	Exon 4	413 bp	B	1
P-312 P-271	ttcaactctgtctccttctc cagccctgtcgtctctcag	F R	Exon 5	248 bp	B	1
P-239 P-240	gcctctgattctcactgat ttaacccctctctccagaga	F R	Exon 6	181 bp	B	1
P-236 P-240	tgctcactgtgacctgact ttaacccctctctccagaga	F R	Exons 5-6	467 bp	B	1
P-333 P-313	cttgccacaggctctcccaa aggggtcagaggcaagcaga	F R	Exon 7	237 bp	C	2
P-237 P-238	aggc <b>g</b> cactggcctcatctt tgctcagggtggcaagtggc	F R	Exon 7	177 bp	B	1
P-316 P-319	ttccttactgaccttctgctt aggcataactgcaccttgg	F R	Exon 8	231 bp	B	1
P-314 P-315	ttgggagttagatggagcct agtgttagactggaaacttt	F R	Exons 8-9	445 bp	B	1
9F 9R	gacaagaagcggggag cggcaattgagtgtagac	F R	Exon 9	215	E	1
P-E10Li P-562	caattgtaactgaaccatc ggatgagaatggaatcctat	F R	Exon 10	260 bp	D	1
P-E11Le P-E11Re	agacc <b>g</b> ctcactcatgtga tgacgcacacctattgcaag	F R	Exon 11	245 bp	B	1

**PCR mix****1. GoTaq Hot Start Polymerase (Promega)**

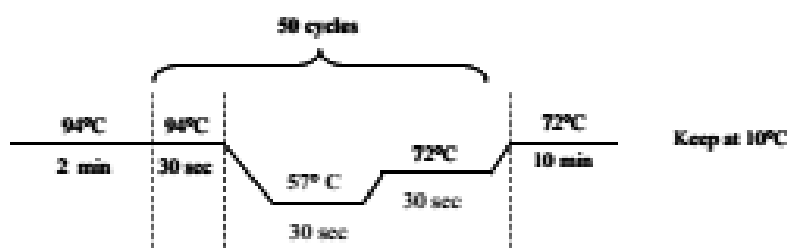
Components	Volume/reaction	Final concentration
- 5X PCR buffer without MgCl <sub>2</sub>	4 µl	1X
- 25mM MgCl <sub>2</sub>	1.2 µl	1.5mM
- dNTP mix (5mM each)	0.8 µl	0.2mM each
- Primer, forward 10µM	0.8 µl	0.4µM
- Primer, reverse 10 µM	0.8 µl	0.4µM
- <u>GoTaq</u> DNA polymerase (5U/µl)	0.1 µl	0.5 U
- Template DNA	50 ng	
- Water, molecular biology grade	Qsp 20 µl	

**2. HotStarTaq (Qiagen)**

Components	Volume/reaction	Final concentration
- 10X PCR buffer containing 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2 µl	1X
- 5X Q-Solution	4 µl	1X
- dNTP mix (5mM each)	0.8 µl	0.2 mM each
- Primer, forward 10uM	0.8 ul µl	0.4 µM
- Primer, reverse 10 uM	0.8 µl	0.4 µM
- HotStarTaq DNA polymerase (5U/µl)	0.1 µl	0.5 U
- Template DNA	50 ng	
- Water, molecular biology grade	Qsp 20 µl	

**PCR programs****A:****B:****C:****D:**

E:



#### Purification of PCR products

Prior sequence analysis, 5  $\mu$ l of PCR products are purified with the enzyme ExoSap-IT (USB) for 15 min at 37°C and 15 min at 80°C.

You may also use:

- columns (i.e. QIAquick PCR Purification kit, QIAGEN)
- plates (i.e. NucleoFast 96 PCR kit, Clontech)

#### TP53 sequencing

Sequencing is performed by IARC common sequencing service.

#### Sequencing reaction

Sequencing reaction is done with BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) according to the following protocol:

##### Mix:

- 7  $\mu$ l of purified PCR product
- 1.25  $\mu$ l Buffer
- 0.5  $\mu$ l primer 10  $\mu$ M\*
- 1.5  $\mu$ l Big Dye

##### Program:

96°C	10 sec	} 30 cycles
50°C	5 sec	
60°C	4 min	

\* Same primers as the ones used for PCR amplification reactions (note that R primer for exon 11 does not work well for sequencing).

#### Purification of sequencing reaction

Before analysis, purification of the sequencing reaction products is done by the Sequencing Service with 96-well Multiscreen filtration plates (G50-Pharmacia-Millipore).

## Apêndice 5

Tabela 12: Resultados da LOH comparados com características clínicas do CCEL

Características	LOH total		p	LOH cromossomo 9		p	LOH cromossomo 17		p
	Não	Sim		Não	Sim		Não	Sim	
<b>Idade</b>									
Abaixo de 45 anos	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,33	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,27	2(66,7%)	1(33,3%)	0,67
Acima de 45 anos	1 (7,1%)	6 (88,2%)		4 (28,6%)	10(71,4%)		10(71,4%)	4(28,6%)	
<b>Cor</b>									
Branco	1(16,7%)	5 (83,3%)	0,59	3(50,0%)	3 (50,0%)	0,33	4(66,7%)	2(33,3%)	0,60
Não Branco	1 (9,1%)	10 (90,9%)		3(27,3%)	8(72,7%)		8(72,7%)	3(27,3%)	
<b>TNM</b>									
Estádio inicial	2(18,2%)	9(81,8%)	0,40	3(27,3%)	8(72,7%)	0,33	9(81,8)	2(18,2%)	0,20
Estádio final	0(0%)	6(100%)		3(50,0%)	3(50,0%)		3(50,0%)	3(50,0%)	
<b>Hábito Tabagista</b>									
Ausente	1(33,3%)	2(66,7%)	0,35	2(66,7%)	1(33,3%)	0,27	2(66,7%)	1(33,3%)	0,67
Presente	1 (7,1%)	13(92,9%)		4(28,6%)	10(71,4%)		10(71,4%)	4(28,6%)	
<b>Hábito Etílista</b>									
Ausente	0(0%)	4(100%)	0,50	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,58	2(50%)	2(50%)	0,33
Presente	2(15,4%)	11(84,6%)		5 (83,3%)	1 (16,7%)		10(76,9%)	3(23,1%)	
<b>Positividade para p53 (1)</b>									
Até 10% das células	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,65	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,44	2(66,7%)	1(33,3%)	0,63
Acima de 10% das células	5 (41,7%)	7 (58,3%)		7 (58,3%)	5 (41,7%)		9(75%)	3(25%)	
<b>Positividade para o Ki-67 (1)</b>									
Até 10% das células	5 (50%)	5 (50%)	0,29	6 (60%)	4 (40%)	0,42	9(90%)	1(10%)	0,77
Acima de 10% das células	1 (20%)	4 (80%)		2 (40%)	3 (60%)		2(40%)	3(60%)	

LOH total: LOH em pelo ao menos um marcador

LOH cromossomo 9: LOH em pelo ao menos um marcador do cromossomo 9

LOH cromossomo 17: LOH em pelo ao menos um marcador do cromossomo 17

- (3) Categorização da marcação imunohistoquímica de acordo a porcentagem de células positivas. (*cutt-off*) em 10%



## Lip cancer and pre-cancerous lesions harbor *TP53* mutations, exhibit allelic loss at 9p, 9q, and 17p, but no BRAFV600E mutations

Gefer Thiago Batista Correa<sup>1</sup> · Vanessa Fátima Bernardes<sup>2</sup> · Sílvia Ferreira de Sousa<sup>1</sup> · Marina Gonçalves Diniz<sup>1</sup> · José Maria Porcaro Salles<sup>3</sup> · Renan Pedra Souza<sup>4</sup> · Alfredo Maurício Batista De-Paula<sup>5</sup> · Ricardo Santiago Gomez<sup>1</sup> · Carolina Cavalieri Gomes<sup>2</sup>

Received: 27 April 2015 / Accepted: 9 June 2015 / Published online: 18 June 2015  
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2015

**Abstract** Molecular mechanisms of lip squamous cell carcinoma (LSCC) and actinic cheilitis (AC) are unclear. We aimed at assessing loss of heterozygosity (LOH) and *TP53* and BRAF V600E mutations in these lesions. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples of 17 LSCC and 16 AC were included, with additional 5 fresh LSCC genotyped for *TP53* mutations. LOH was assessed by six polymorphic markers located at 9p22, 9q22, and 17p13 and correlated with cell proliferation (Ki-67) and P53 immunostaining. Direct sequencing of *TP53* exons 2–11 (fresh samples), and exons 5–9 (FFPE samples) was carried out. BRAF V600E mutation was genotyped in eight LSCC. LOH occurred in at least one marker in 15/17 LSCC and in 9/16 AC. The marker exhibiting the highest frequency of allelic loss (FAL) in LSCC was D9S157 (8/12 informative cases) and D9S287 in AC (4/11 informative cases). Cell proliferation was not correlated with

LOH or with the FAL and no correlation between P53 IHC and 17p LOH was observed. We found *TP53* missense mutations in both lesions and nonsense in LSCC, including CC>TT transition, which is a marker of UV damage. BRAF V600E mutation was not detected. LOH and *TP53* mutations detected in LSCC and AC may be associated with tumorigenesis, whereas BRAF V600E mutation does not seem to significantly contribute to LSCC pathogenesis.

**Keywords** Actinic cheilitis · LOH · p53 · Potentially malignant oral lesions · Lip squamous cell carcinoma · Head and neck cancer

### Introduction

Lip squamous cell carcinoma (LSCC) is a malignant epithelial neoplasm that affects the vermilion of the lips. Data of LSCC incidence in Brazil is imprecise, as the Brazilian National Cancer Institute (INCA) groups together lip and intraoral squamous cell carcinomas. For 2014, it was predicted that ~15,000 new cases of oral and lip cancer in Brazil will be diagnosed, or an age standardized rate (ASR) of 11.5/100,000 (men) and 4/100,000 (women) [1]. Most cases are diagnosed between the sixth and seventh decade of life, and it is more common on the lower lip than the upper lip [6, 7, 5, 8]. Unlike oral squamous cell carcinoma (OSCC) for which tobacco is an established main risk factor, the etiology of LSCC is highly associated with UV radiation exposure [2–8].

Actinic cheilitis (AC) is a white-red plaque with ulcerative areas, which affects the lip vermilion. It mainly occurs in men in their fifth decade of life, with chronic exposure to sunlight being the major risk factor [9–12]. It is considered to be a

✉ Carolina Cavalieri Gomes  
carolinacgomes@ufmg.br

<sup>1</sup> Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup> Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

<sup>3</sup> Department of Surgery, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup> Department of General Biology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

<sup>5</sup> Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Minas Gerais, Brazil

potentially malignant lesion with shared etiologic factors and clinical features with LSCC [13, 14].

The molecular mechanism underlying LSCC and AC pathogenesis have scarcely been investigated [15–17]. As these lesions occur in a transition area between the oral mucosa and skin, it is important to understand if molecular pathogenesis is similar to intraoral squamous lesions or cutaneous carcinoma. Thus, the aim of this study was to investigate several putative candidate genes and genomic regions seemingly associated with the pathogenesis of these tumors, including LOH at chromosomes 9 and 17p [18–24], and *TP53* and BRAF V600E mutations.

## Material and methods

### Samples

The study was approved by the local Ethics Committee (UFMG/ COEP n.99.057/2012). We included a convenience sample of 17 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples of LSCC and 16 FFPE samples of AC from the files of the Oral Pathology Service of the University. Clinical and epidemiological data were obtained from files. Much of the medical records were filled incompletely, and important features such as time of exposure to sunlight or type of occupation (with or without sun exposure) were not addressed. All LSCC patients were staged according to the UICC TNM Classification of Malignant Tumors (2002) [25]. For AC, the maximum dimension in millimeter of these lesions was obtained. Additionally, five samples of fresh LSCC tumors were collected prospectively and used for the *TP53* sequencing (Fig. 1). A portion of these fresh tissues were obtained during resection surgery of the lesion, immediately snap frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Frozen section samples of the solid tumors were dissected. Diagnosis of all specimens was confirmed by histopathological analysis.

### DNA extraction

H&E-stained sections were examined by a pathologist for the presence of normal and tumor tissue in LSCC, and normal and epithelial tissue in AC. Lamina propria and submucosa tissues were considered as normal tissues, while normal appearance epithelial tissue was not considered normal tissue due to cancerization field possibility and were then discarded. Tissue was microdissected from a series of 20- $\mu\text{m}$ -thick FFPE tissue sections. The cases that showed highly diffuse inflammatory infiltrate or presented a high chance of contamination of tumour tissue by normal tissue during manual separation undergone laser microdissection using MMI IX-81 cell cut Olympus (MMI AG – Olympus – Glattpburg, Switzerland), following standard protocols [26].

Microdissected tissue was digested with proteinase K, and genomic DNA was isolated using QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA), following the manufacturer's instructions.

### Loss of heterozygosity analysis

Loss of heterozygosity (LOH) was investigated using a panel of six polymorphic microsatellite markers for genetic loci flanking regions of tumor suppressor genes (Fig. 2). Markers and regions evaluated were as follows: P53 (17p13.1), AFM238WF2 (17p13.1), D9S162 (9p22-p13), D9S171 (9p22-p21), D9S157 (9p22), and D9S287 (9q22.3). Primers and PCR conditions used are described elsewhere [27, 28]. The amplified PCR products were detected in 8 % polyacrylamide gel and were submitted to capillary electrophoresis on a ABI PRISM 310 sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and data was analyzed using the Genescan software version 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). LOH was calculated as the ratio between short allele-normal (Sn)/long allele normal (Ln) and short allele-tumor (St)/long allele tumor (Lt), in the following formula:  $(\text{Sn}:\text{Ln})/(\text{St}:\text{Lt})$ . LOH was scored if one allele was decreased by more than 50 % at the tumor sample when compared with the same allele at normal tissue. When necessary, stutter correction was performed [29]. When DNA from normal tissue showed only one peak corresponding to two equal-sized alleles, the case was considered homozygous. When it was not possible to analyze the results or when they were inconclusive, the case was considered non-informative. The frequency of allelic loss (FAL) was calculated for each sample and marker by dividing the number of loci that showed allelic loss by the number of informative loci.

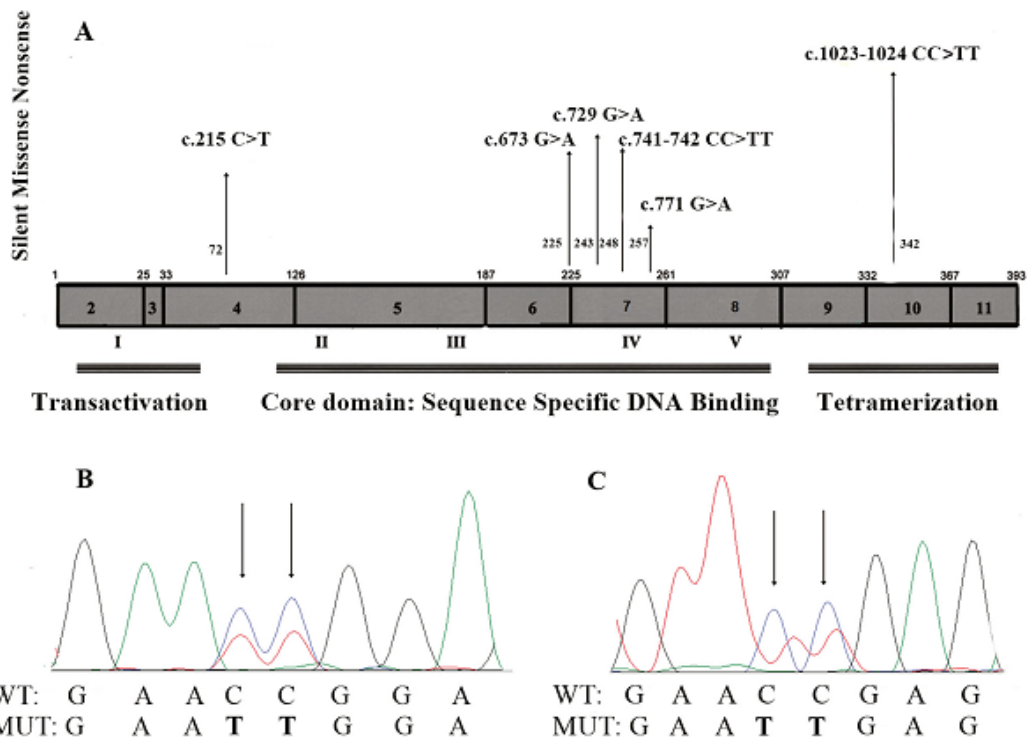
### Immunohistochemistry

Immunohistochemical reactions to detect Ki-67 and P53 proteins were performed following the standard procedures as published elsewhere [27], using primary antibody clones MIB-1 and DO7, respectively. For each reaction set, a squamous cell carcinoma sample with known reactivity was used as a positive control, and negative controls comprised cases in which the primary antibody was omitted. The percentage of the P53 and Ki-67 positive nuclei was calculated by counting nuclear staining in tumor tissue cells in eight high-power fields ( $\times 400$  magnification) and total number of tumor cells in each field. After that, a cutoff of 10 % of labeled cells for P53 was set. For Ki-67, the results are shown as percentage.

### *TP53* sequencing

Due to FFPE sample size restriction, only hotspot mutation regions of *TP53* were sequenced in these samples, comprising





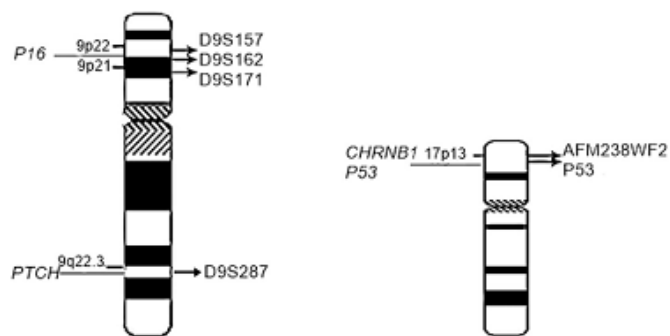
**Fig. 1** Alterations found in the *TP53* exons. **a** Distribution of *TP53* mutations in relation to the P53 protein functional region. **b**, **c** Screen shots from sequencing electropherograms. **b** A LSCC (sample #21)

showed a missense mutation in exon 7 (c.741\_742CC>TT). **c** A LSCC (sample #19) showed a nonsense mutation in exon 10 (c.1023\_1024CC>TT). *WT* wild-type, *MUT* mutant

exons 5, 6, 7, 8, and 9. For the LSCC, we included five extra fresh tumor samples (LSCC #18-22) in which we sequenced all *TP53* coding exons (exons 2 to 11). All reactions were done at least twice, but as we could not obtain reliable electropherograms of all exons for all samples, we excluded all poor quality results. GenBank accession number

NC\_000017.9 was used where the nucleotide +1 corresponds to the first A of exon 1. Amplified products were detected by electrophoresis on 6.5 % polyacrylamide gels with silver staining. PCR products were purified with GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kits (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) and sequenced on an ABI PRISM

**Fig. 2** Location of the polymorphic microsatellite markers at the chromosomes. Chromosome 9 is represented on the left and chromosome 17 on the right. On the left side of each chromosome, the location of the markers is shown, as well as the main genes found in these chromosomal loci. On the right of each chromosome, the markers are shown



310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Sequences were manually checked and a search was conducted in the main genetic mutations databases (IARC - <http://p53.iarc.fr/>, COSMIC <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>, and 1000GENOMES <http://www.1000genomes.org/data>) to check if the changes had already been described.

#### BRAF V600E mutation detection

To assess the oncogenic mutation BRAFV600E, we carried out real-time PCR with genomic DNA and a TaqMan assay for the reference gene (BRAF\_476\_wt) and for the mutant allele (BRAF\_476\_mu) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's instruction. Negative samples for the mutation showed a curve amplification only for the reference gene assay.

#### In silico analysis

To predict whether *TP53* found changes could affect protein stability and functionality, we used two online tools, PolyPhen-2 ([genetics.bwh.harvard.edu/pph2/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)) giving scores for the mutation of damage ranging from zero to one (being the score one the worst result) and SIFT ([sift.jcvi.org](http://sift.jcvi.org)) with scores ranging from zero to one, with zero the worst result.

#### Statistical analysis

Data is presented as mean±standard deviation. Statistical analyses were carried out using SPSS version 21.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Categorical variables were compared using Fisher exact tests. Nominally, significant associations were claimed when  $p$  value<0.05. Chi-square test was used to test association between LOH at each marker in AC and LSCC with the immunohistochemistry (IHC) results. LOH was categorized as present and absent, and the immunohistochemistry data were grouped into two categories: ≤10 % and >10 % of positive P53 nuclei and ≤5 % or >5 % Ki-67 positive nuclei.

## Results

#### Clinical characterization of the samples

Clinical-pathological data of the cases included in the study are shown in Tables 1 and 2. LSCC subjects ( $n=17$ ) were diagnosed at a mean age of  $64.5\pm 17.98$  years while AC subjects ( $n=16$ ) were diagnosed at a mean age of  $55.2\pm 15.24$  years. No age ( $p=0.123$ ) or gender ( $p=0.601$ ) difference were observed between groups. All evaluated lesions are located in the lower lip.

#### LOH and IHC results

LOH was observed in at least one marker in 88.2 % of LSCC cases (15/17) and 56.3 % of AC cases (9/16). However, LOH occurrence did not achieve nominally significant statistical difference between groups ( $p$  value>0.05). The highest marker FAL was seen at the D9S157 among LSCC cases (8/12 informative cases or 66.6 %) and D9S287 among AC cases (4/11 or 36.3 %). LOH at the D9S157 marker was more frequently found in LSCC group (66.6 % or 8/12 while 22 % or 2/9 in AC) although it was not a nominally significant difference ( $p$  value>0.05).

LSCC IHC results showed positive staining in more than 10 % of cells for P53, and the median percentage of Ki-67 staining was 70 %. Twelve of 15 cases (80.0 %) of the AC cases showed more than 10 % P53 immunopositivity, and the median percentage of Ki-67 staining was 5 %. Ki67 IHC results reflect cell proliferation activity, and they were neither associated with LOH at any marker nor with the FAL (data not shown). In addition, P53 IHC detection was not different between the cases with LOH or allelic retention at each chromosome 17 marker.

#### TP53 sequence alterations

After manual evaluation of the electropherograms, a total of 3 AC sample results were included for *TP53* exons 5 and 6, 10 samples for exon 7, and 4 samples for exons 8 and 9. For the LSCC cases, *TP53* mutations could be evaluated in exons 5 and 6 in 11 samples, exon 7 in 12 samples, and exons 8 and 9 in 9 samples and the other exons (2, 3, 4, 10, 11) were evaluated in all 5 fresh samples. Missense or nonsense mutations were detected in exon 7 (2 LSCC and 2 AC) and exon 10 (1 LSCC). Results are shown in Table 2 and Fig. 1.

#### BRAF V600E mutation assessment

Eight LSCC samples had sufficient genomic DNA amount and could be tested for the mutation. The eight samples did not harbor V600E mutation, i.e., were wild-type. These samples are identified in Table 1.

#### Discussion

LOH has been an important tool for genomic characterization during tumor progression in several cancers, including skin lesions (squamous and basal cell carcinoma, melanoma, melanocytic nevus, and actinic keratosis) [30]. We aimed to assess if LOH at these chromosomes (9 and 17) also occur in LSCC and AC and if these entities show different LOH profile. In the subset of lip squamous neoplasms and potentially malignant samples investigated, LOH occurred in at least one

**Table 1** Clinical data of the LSCC and AC samples, and immunohistochemistry and LOH results

Identification	Clinical data			IHC		Microsatellite markers						
	Lesion	Gender	Age	TNM/size (mm)	P53	Ki-67	P53	AFM238WF2	D9S287	D9S171	D9S157	D9S162
LSCC #1	M	89	T3N2M0	>10 %	67 %	△	●	○	○	○	○	○
LSCC #2 <sup>a</sup>	M	44	T1N0M0	NR	NR	○	●	□	○	△	□	□
LSCC #3 <sup>a</sup>	M	92	T4N1M0	NR	NR	□	○	□	○	●	●	●
LSCC #4	M	30	T2N0M0	>10 %	5 %	○	○	○	●	●	□	□
LSCC #5	M	77	T1N0M0	>10 %	75 %	□	□	●	○	□	□	○
LSCC #6 <sup>a</sup>	M	61	T1N0M0	>10 %	5 %	○	○	○	○	□	□	○
LSCC #7	M	56	T2N0M0	>10 %	1 %	●	□	□	□	●	○	○
LSCC #8	M	58	T3N0M0	>10 %	1 %	○	○	□	○	●	●	●
LSCC #9	M	83	T1N0M0	NR	NR	□	□	○	○	●	○	□
LSCC #10 <sup>a</sup>	M	78	T1N0M0	>10 %	75 %	□	○	○	●	□	□	○
LSCC #11 <sup>a</sup>	M	60	T3N2MX	>10 %	96 %	○	○	○	□	●	○	○
LSCC #12 <sup>a</sup>	M	71	T3N1M0	>10 %	73 %	△	○	□	△	●	□	□
LSCC #13	F	52	T2N0M0	>10 %	49 %	●	○	○	□	○	○	△
LSCC #14	M	59	T4N2M0	>10 %	80 %	○	○	○	○	●	●	●
LSCC #15 <sup>a</sup>	M	88	T1N0M0	>10 %	NR	□	●	□	□	△	□	□
LSCC #16 <sup>a</sup>	M	58	T2N0M0	NR	NR	△	○	△	●	○	□	□
LSCC #17	M	41	T2N0M0	>10 %	83 %	□	○	□	△	○	□	□
AC #1	M	44	5	<10 %	35 %	●	△	●	□	□	□	○
AC #2	M	40	9	>10 %	1 %	○	○	○	□	●	△	△
AC #3	M	56	15	>10 %	25 %	○	○	□	△	□	□	○
AC #4	M	56	10	>10 %	1 %	□	○	●	□	△	□	□
AC #5	M	68	5	>10 %	5 %	□	○	△	□	○	○	○
AC #6	M	54	5	>10 %	5 %	□	○	○	□	●	○	○
AC #7	M	38	7	<10 %	5 %	○	□	○	○	○	○	○
AC #8	M	80	20	>10 %	1 %	△	□	○	□	○	○	△
AC #9	M	46	9	>10 %	22 %	●	□	●	□	△	○	○
AC #10	M	-	30	>10 %	68 %	△	○	●	●	○	□	□
AC #11	M	63	9	<10 %	5 %	△	○	○	○	△	●	●
AC #12	F	54	20	>10 %	1 %	○	○	○	□	□	□	□
AC #13	F	27	3	>10 %	5 %	●	●	□	○	□	○	○
AC #14	M	56	9	>10 %	75 %	○	●	□	○	○	○	○
AC #15	M	56	9	>10 %	1 %	○	○	○	○	○	○	△
AC #16	M	62	10	NR	NR	○	○	□	□	○	○	○

LSCC samples #2, #3, #9, #15, and #16 were excluded from statistical test of association between LOH and IHC, as tissue was not reactive in the IHC. AC sample #16 was excluded in the statistical test of association between LOH and IHC

LSCC lip squamous cell carcinoma, AC actinic cheilitis, ○ heterozygous, □ homozygous, ● loss of heterozygosity, △ non-informative, FAL frequency of allelic loss of each case, IHC immunohistochemistry

<sup>a</sup> These eight LSCC samples were tested for the BRAF V600E mutation, being wild-type

sample at all markers, in both groups, showing no statistically significant differences between LSCC and AC. There was no LOH profile associated either with LSCC or AC and LOH was revealed a common finding in both groups of lip lesions.

There are important tumor suppressor genes located in these chromosomal regions we studied, including *P16* (9p), *PTCH* (9q), and *TP53* (17p). All the markers included in our

study are intergenic; thus, LOH at these markers does not necessarily mean inactivation of the tumor suppressor genes located around these loci. Interestingly, the P53 IHC detection was similar between LSCC and AC that showed allelic retention or LOH at the chromosome 17 markers. Cell proliferation was estimated by KI-67 IHC and was not different according to LOH status or FAL.

**Table 2** Distribution of *TP53* gene molecular alterations in exons

Diagnosis	Mutation	Location	Effects	Predicted effects on protein <sup>a</sup>	Sample
Actinic cheilitis	c.673G>A	Exon 7	Missense	Benign	#4
	c.729G>A	Exon 7	Missense	Damaging	#13
LSCC	c.215C>G	Exon 4	Missense <sup>b</sup>	Benign	#18, #19, #20, #22
	c.771G>A	Exon 7	Synonymous	Unknown	#19
	c.741_742CC>TT	Exon 7	Missense	Damaging	#21
	c.1023_1024CC>TT	Exon 10	Nonsense	Damaging	#19

<sup>a</sup> Prediction was obtained by using the online softwares, PolyPhen-2 ([genetics.bwh.harvard.edu/pph2/](http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)) and SIFT ([sift.jcvi.org](http://sift.jcvi.org))

<sup>b</sup> This is the SNP rs1042522

LSCC #18–22 are fresh tumor samples

The absorption of UVB by the skin causes the formation of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and pyrimidine (6–4) pyrimidone photoproducts (6-4PPs) [31]. These two DNA lesions may give rise to specific mutations comprising the transition C>T or CC>TT sequences in di-pyrimidines [32, 33]. The human tumor suppressor gene, *TP53* is mutated in about 50 % of human cancer samples [34]. A high rate of mutations of *TP53* were previously reported in LSCC at dipyridine sites (13/18); among these, eight were C>T transitions and 1 CC>TT tandem base transition, which are characteristic of UV-induced DNA damage. These authors found a difference in the mutation profile between LSCC and intraoral cancer, with transitions being more common in the first [17]. Interestingly, we found one missense and one nonsense mutation characterized by CC>TT transition in LSCC. The missense and nonsense mutation we detected in LSCC were both detected in fresh tumor samples, discarding the possibility of them being artificial mutation induced by formalin fixation [35]. These CC>TT *TP53* mutations have been described in cultured human skin cells after UV radiation, as well as in a large percentage of normal skin from sun-exposed sites on Australian skin cancer patients [36]. However, these mutations were not found in all samples. The two missense mutations we found in AC are G>A transition. We did not detect CC>TT mutation in the AC, although these are lesions associated with UV exposure. This may be explained by the small amount of AC cases that resulted in neat electropherograms and, therefore, not all exons could be evaluated (exons 5–6,  $n=3$ ; exon 7,  $n=10$  and exons 8–9,  $n=4$ ).

Somatic mutations in non-coding genomic regions are common in cancer, but their exact role in cancer pathogenesis needs to be completely clarified [37, 38]. We found *TP53* intronic changes in our samples of LSCC and AC (data not shown).

Unfortunately, no conclusion can be drawn associating the LOH results at chromosome 17 and *TP53* mutations. The missense and nonsense mutations found in LSCC were in the fresh samples, for which no LOH is available. Interestingly, the AC #4 showed a missense mutation in exon 7 and was homozygous for one 17p marker and showed allelic retention at the other, and sample #13 showed LOH in both markers in association with *TP53* exon mutation.

*BRAF* mutations have been extensively reported in melanomas and, interestingly, these mutations are more frequently reported in melanomas arising in non-chronic sun-damaged skin [39, 40]. In a recent series of 66 intraoral squamous cell carcinoma of the tongue, only 1 sample showed *BRAF* mutation [41], and in other intraoral squamous cells carcinoma series, *BRAF* mutation was not detected in any sample [42]. In cutaneous squamous cells carcinomas, *BRAF* mutations are not detected either in spontaneous or in secondary tumors (occurring in patients under *RAF* inhibitor or immunosuppression therapy) [43, 44]. Despite the relatively small number of samples tested for *BRAF* V600E mutation, our results are consistent with a lack, or very low frequency, of *BRAF* V600E mutations in LSCC, similarly to intraoral and cutaneous squamous cells carcinomas.

## Conclusion

In conclusion, we show evidence of LOH at chromosomes 9p, 9q, and 17p in AC and lip carcinomas and report *TP53* mutations in both groups, as well as lack of *BRAF* V600E mutation in the subset of LSCC studied.

**Acknowledgments** This study was supported in part by the following Brazilian funding agencies: Coordination for the Improvement of Higher

Education Personnel (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil. R.S. Gomez, C.C. Gomes, De-Paula A.M.B., and R.P. Souza are research fellows at CNPq. The authors acknowledge the Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICBUFG) for the LMD technical support.

**Conflicts of interest** None

## References

- INCA. Estimativa 2014 – incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva 2014;1:124.
- Pogoda JM, Preston-Martin S. Solar radiation, lip protection, and lip cancer risk in Los Angeles County women (California, United States). *Cancer Causes Control*. 1996;7(4):458–63.
- Souza RL, Fonseca-Fonseca T, Oliveira-Santos CC, Correa GT, Santos FB, Cardoso CM, et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011;16(6):e757–62.
- Sugerman PB, Savage NW. Oral cancer in Australia: 1983–1996. *Aust Dent J*. 2002;47(1):45–56.
- Moore S, Johnson N, Pierce A, Wilson D. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis*. 1999;5(3):185–95.
- Krolls SO, Hoffman S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14,253 cases by age, sex, and race of patients. *J Am Dent Assoc*. 1976;92(3):571–4.
- Lindqvist C. Risk factors in lip cancer: a questionnaire survey. *Am J Epidemiol*. 1979;109(5):521–30.
- Ostman J, Anneroth G, Gustafsson H, Tavelin B. Malignant oral tumours in Sweden 1960–1989—an epidemiological study. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995;31b(2):106–12.
- Main JH, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc*. 1994;60(2):113–6.
- Kaugars GE, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;88(2):181–6.
- Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008;66(3):498–503. doi:10.1016/j.joms.2006.09.016.
- Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis*. 2004;10(4):212–6. doi:10.1111/j.1601-0825.2004.01004.x.
- van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. 2009;45(4–5):317–23. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.05.016.
- Anwar J, Wrona DA, Kimyai-Asadi A, Alam M. The development of actinic keratosis into invasive squamous cell carcinoma: evidence and evolving classification schemes. *Clin Dermatol*. 2004;22(3):189–96. doi:10.1016/j.clindermatol.2003.12.006.
- Milasin J, Pujic N, Dedovic N, Nikolic Z, Petrovic V, Dimitrijevic B. High incidence of H-ras oncogene mutations in squamous cell carcinoma of lip vermilion. *J Oral Pathol Med*. 1994;23(7):298–301.
- Chou A, Dekker N, Jordan RC. Identification of novel fibroblast growth factor receptor 3 gene mutations in actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(4):535–41. doi:10.1016/j.tripleo.2008.12.050.
- Ostwald C, Gogacz P, Hillmann T, Schweder J, Gundlach K, Kundt G, et al. p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. *Int J Cancer*. 2000;88(1):82–6.
- Gomes CC, Fonseca-Silva T, Galvao CF, Friedman E, De Marco L, Gomez RS. Inter- and intra-lesional molecular heterogeneity of oral leukoplakia. *Oral Oncol*. 2015;51(2):178–81. doi:10.1016/j.oraloncology.2014.11.003.
- Murali A, Sailasree R, Sebastian P, Rejnish Kumar R, Varghese BT, Kannan S. Loss of heterozygosity of D9S162: molecular predictor for treatment response in oral carcinoma. *Oral Oncol*. 2011;47(7):571–6. doi:10.1016/j.oraloncology.2011.04.009.
- Graveland AP, Golusinski PJ, Buijze M, Douma R, Sons N, Kuik DJ, et al. Loss of heterozygosity at 9p and p53 immunopositivity in surgical margins predict local relapse in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2011;128(8):1852–9. doi:10.1002/ijc.25523.
- Cabral LS, Festa Neto C, Sanches Jr JA, Ruiz IR. Genomic instability in human actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(4):523–8.
- Saridaki Z, Liloglou T, Zafiroopoulos A, Koumantaki E, Zoras O, Spandidos DA. Mutational analysis of CDKN2A genes in patients with squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol*. 2003;148(4):638–48.
- Kushida Y, Miki H, Ohmori M. Loss of heterozygosity in actinic keratosis, squamous cell carcinoma and sun-exposed normal-appearing skin in Japanese: difference between Japanese and Caucasians. *Cancer Lett*. 1999;140(1–2):169–75.
- Happle R. Loss of heterozygosity in human skin. *J Am Acad Dermatol*. 1999;41(2 Pt 1):143–64.
- Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. Wiley; 2009.
- Stokes A, Drozdov I, Guerra E, Ouzounis CA, Warnakulasuriya S, Gleeson MJ, et al. Copy number and loss of heterozygosity detected by SNP array of formalin-fixed tissues using whole-genome amplification. *PLoS ONE*. 2011;6(9):e24503. doi:10.1371/journal.pone.0024503.
- Gomes CC, Fonseca-Silva T, Gomez RS. Evidence for loss of heterozygosity (LOH) at chromosomes 9p and 17p in oral granular cell tumors: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;115(2):249–53. doi:10.1016/j.oooo.2012.11.011.
- Farias LC, Gomes CC, Brito JA, Galvao CF, Diniz MG, de Castro WH, et al. Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. *Hum Pathol*. 2012;43(8):1229–33. doi:10.1016/j.humpath.2011.08.026.
- van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Denkers F, Wishaupt RG, Kummer JA, et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res*. 2000;6(10):3803–16.
- Ribeiro GR, Francisco G, Teixeira LV, Romão-Correia RF, Sanches Jr JA, Neto CF, et al. Repetitive DNA alterations in human skin cancers. *J Dermatol Sci*. 2004;36(2):79–86. doi:10.1016/j.jdermsci.2004.08.003.
- Ziegler A, Jonason A, Simon J, Leffell D, Brash DE. Tumor suppressor gene mutations and photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol*. 1996;63(4):432–5.
- Lincoln EA. Sun-induced skin changes. *Prim Care*. 2000;27(2):435–45.
- Sinha RP, Hader DP. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1(4):225–36.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007;28(6):622–9. doi:10.1002/humu.20495.

35. Wong SQ, Li J, Tan AY, Vcdururu R, Pang JM, Do H, et al. Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. *BMC Med Genomics*. 2014;7:23. doi:10.1186/1755-8794-7-23.
36. Nakazawa H, English D, Randell PL, Nakazawa K, Martel N, Armstrong BK, et al. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(1):360–4.
37. Weinhold N, Jacobsen A, Schultz N, Sander C, Lee W. Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer. *Nat Genet*. 2014;46(11):1160–5. doi:10.1038/ng.3101.
38. Supek F, Miñana B, Valcárcel J, Gabaldón T, Lehner B. Synonymous mutations frequently act as driver mutations in human cancers. *Cell*. 2014;156(6):1324–35. doi:10.1016/j.cell.2014.01.051.
39. Pracht M, Mogha A, Lespagnol A, Fautrel A, Mouchet N, Le Gall F, et al. Prognostic and predictive values of oncogenic BRAF, NRAS, c-KIT and MITF in cutaneous and mucous melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venerol*. 2015. doi:10.1111/jdv.12910.
40. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2011;164(4):776–84. doi:10.1111/j.1365-2133.2010.10185.x.
41. Tan DS, Wang W, Leong HS, Sew PH, Lau DP, Chong FT, et al. Tongue carcinoma infrequently harbor common actionable genetic alterations. *BMC Cancer*. 2014;14:679. doi:10.1186/1471-2407-14-679.
42. Koumaki D, Kostakis G, Koumaki V, Papadogeorgakis N, Makris M, Katoulis A, et al. Novel mutations of the HRAS gene and absence of hotspot mutations of the BRAF genes in oral squamous cell carcinoma in a Greek population. *Oncol Rep*. 2012;27(5):1555–60. doi:10.3892/or.2012.1653.
43. Oberholzer PA, Kee D, Dziurycz P, Sucker A, Kamsukom N, Jones R, et al. RAS mutations are associated with the development of cutaneous squamous cell tumors in patients treated with RAF inhibitors. *J Clin Oncol*. 2012;30(3):316–21. doi:10.1200/jco.2011.36.7680.
44. Zaravinos A, Kanellou P, Baritaki S, Bonavida B, Spandidos DA. BRAF and RKIP are significantly decreased in cutaneous squamous cell carcinoma. *Cell Cycle*. 2009;8(9):1402–8.